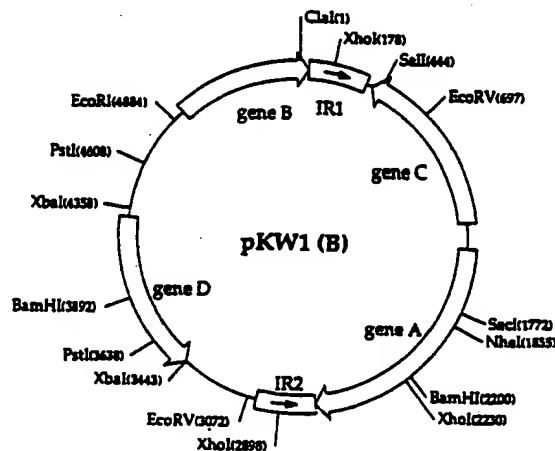
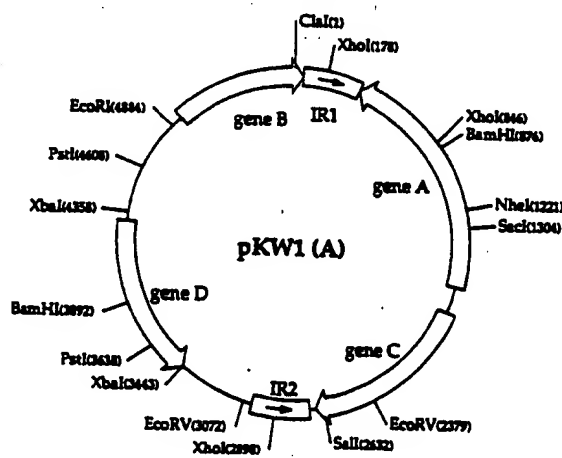


PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/81	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/00437 (43) Date de publication internationale: 7 janvier 1993 (07.01.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00559 (22) Date de dépôt international: 19 juin 1992 (19.06.92) (30) Données relatives à la priorité: 91/07640 21 juin 1991 (21.06.91) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHÔNE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : CHEN, Xin-Jie [CN/FR]; 15, rue Georges-Clémenceau, Centre Universitaire Orsay, F-91405 Orsay (FR). FLEER, Reinhard [DE/FR]; 47, avenue Beauséjour, F-91440 Bures-sur-Yvette (FR). FUKUHARA, Hiroshi [JP/FR]; 160, avenue du Général-Leclerc, Résidence de Courcelles - Bât. 7, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR).		(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR). (81) Etats désignés: AU, CA, FI, HU, JP, NO, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>

(54) Title: **CLONING AND/OR EXPRESSION VECTORS, PREPARATION AND USE**(54) Titre: **VECTEURS DE CLONAGE ET/OU D'EXPRESSION, PRÉPARATION ET UTILISATION**

(57) Abstract

The invention discloses a new yeast plasmid, new cloning and/or expression vectors derived from said plasmid, and use thereof.

(57) Abrégé

L'invention concerne un nouveau plasmide de levure, de nouveaux vecteurs de clonage et/ou d'expression dérivés de celui-ci et leur utilisation.

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	FI	Finland	ML	Mali
AU	Australia	FR	France	MN	Mongolia
BB	Barbados	GA	Gabon	MR	Mauritania
BE	Belgium	GB	United Kingdom	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NL	Netherlands
BG	Bulgaria	GR	Greece	NO	Norway
BJ	Benin	HU	Hungary	PL	Poland
BR	Brazil	IE	Ireland	RO	Romania
CA	Canada	IT	Italy	RU	Russian Federation
CF	Central African Republic	JP	Japan	SD	Sudan
CG	Congo	KP	Democratic People's Republic of Korea	SE	Sweden
CH	Switzerland	KR	Republic of Korea	SN	Senegal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	TD	Chad
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	US	United States of America
DK	Denmark	MG	Madagascar		
ES	Spain				

VECTEURS DE CLONAGE ET/OU D'EXPRESSION
PREPARATION ET UTILISATION

La présente invention concerne un nouveau plasmide de levure, ainsi que de nouveaux vecteurs de clonage et/ou d'expression dérivés de celui-ci, leur
5 préparation et leur utilisation, notamment pour la production de protéines recombinantes. L'invention concerne aussi les cellules hôtes recombinées contenant de tels vecteurs.

Plus particulièrement, la présente invention concerne tout ou partie d'un nouveau plasmide isolé à partir de la levure Kluyveromyces waltii ou d'un dérivé
10 de celui-ci, et les vecteurs de clonage et/ou d'expression construits à partir de celui-ci.

Au cours des dix dernières années, la levure est apparue comme un microorganisme hôte très prometteur pour la production de protéines hétérologues.

En particulier, la mise en évidence par Beggs et al (Nature 275 (1978)
15 104) du plasmide 2 μ et de vecteurs dérivés de celui-ci a été l'une des clés du développement actuel de l'étude génétique et moléculaire de la levure Saccharomyces cerevisiae. Depuis, le système 2 μ a permis d'introduire et d'exprimer des gènes hétérologues dans la levure afin d'obtenir des protéines d'intérêt pharmaceutique ou agro-alimentaire. Cependant, le plasmide 2 μ et ses
20 dérivés ne peuvent se répliquer efficacement que dans les levures appartenant à l'espèce S.cerevisiae et à quelques espèces proches de celle-ci. Ce système ne peut donc pas être utilisé pour la manipulation génétique dans la plupart des espèces de levure. Notamment, il n'est pas utilisable dans les levures dont les propriétés physiologiques, distinctes de celles de S.cerevisiae, permettraient des applications
25 nouvelles et/ou des exploitations industrielles plus performantes.

Différents laboratoires ont donc recherché d'autres plasmides dans des espèces variées de levure. Ainsi, plusieurs plasmides circulaires ont été trouvés chez la levure du genre Zygosaccharomyces, et notamment les plasmides pSR1 et pSR2 (Toh-é et al., J. Bacteriol. 151 (1982) 1380) ; pSB1, pSB2, pSB3 et pSB4
30 (Toh-é et al., J. Gen. Microbiol., 130 (1984) 2527) ; et pSM1 (Utatsu et al., J. Bacteriol. 169 (1987) 5537). Un plasmide circulaire a également été trouvé chez Kluyveromyces drosophilum: pKD1 (Falcone et al., Plasmid 15 (1986) 248).

Tous ces plasmides présentent des caractéristiques communes avec le

plasmide 2 μ , et notamment des séquences répétées inversées, et l'existence sous deux formes isomériques possibles due à un système de recombinaison site-spécifique.

5 Cependant, ces plasmides présentent toujours l'inconvénient d'avoir un spectre d'hôte étroit. Ainsi, en raison de leur spécificité vis-à-vis des espèces hôtes de levure, ces plasmides ne peuvent être utilisés que dans un nombre limité de souches.

10 La présente invention résulte de la mise en évidence d'un plasmide naturel de la levure Kluyveromyces waltii. Ce plasmide, nommé pKW1, est le premier plasmide naturel connu de cette espèce de levure. Purifié à partir de la souche K.waltii CBS 6430, ce plasmide a été cartographié au moyen d'enzymes de restrictions, et la carte résultante est présentée sur la figure 1.

Un objet de l'invention réside donc dans le plasmide pKW1 isolé à partir de la souche K.waltii CBS6430, ou tout fragment ou dérivé de celui-ci.

15 Par dérivé, on entend au sens de l'invention les plasmides qui, en dépit de quelques modifications, conservent les propriétés du plasmide de départ. Notamment, les modifications peuvent prendre la forme de mutations ou de délétions portant sur des régions d'une importance relative. Il peut s'agir également d'insertions ou de suppressions, comme par exemple de sites de clonage.

20 Par fragment de pKW1, on entend notamment les différents éléments génétiques de ce plasmide. Plus préférentiellement, comme éléments génétiques de pKW1, on peut citer notamment les gènes de structure ou des parties de ceux-ci, des séquences promotrices fonctionnelles, les séquences répétées inversées (IR), ou encore les séquences permettant la réplication (origine de réplication) ou conférant la stabilité au plasmide (locus de stabilité).

25 En effet, l'étude structurale du plasmide pKW1 a permis de mettre en évidence des analogies avec le plasmide 2 μ de S.cerevisiae. Ainsi, 4 gènes de structure ont été mis en évidence (voir figure 2), ainsi qu'une origine de réplication. Par ailleurs, le clonage de pKW1 dans E.coli a permis d'isoler 4 types de plasmides recombinés, correspondant à 2 formes isomériques du plasmide pKW1 (les formes A et B) clonées dans le vecteur pKan21 dans les deux orientations possibles (le vecteur pKan21 est décrit dans l'exemple 3.1). Ces deux formes sont représentées sur la figure 1. L'existence de deux formes isomériques indique la présence de séquences répétées inversées. L'étude a ainsi montré que le plasmide pKW1

contient une paire de séquences répétées inversées de 0,3 kb chacune, et deux séquences uniques de 2,5 et 2,3 kb, dont l'orientation distingue les 2 formes isomériques A et B. La taille moléculaire du plasmide pKW1 est donc de 5,5 kb environ. Différents sites de restriction ont été mis en évidence et, à titre d'exemple, les sites uniques suivants : EcoRI, SphI, SalI, ClaI, NheI et BglI.

La séquence nucléotidique complète du plasmide pKW1 a également été déterminée (figure 3). L'absence d'homologie entre cette séquence et celle de plasmides connus a été démontrée, notamment par des expériences d'hybridation (voir exemple 2). L'absence d'hybridation en conditions de stringence modérée est caractéristique de cette différence de séquence.

Dans un mode préféré, l'invention a pour objet un plasmide comprenant tout ou partie de la séquence présentée à la figure 3 ou d'un dérivé de celle-ci.

Par ailleurs, la Demanderesse a également montré qu'il est possible d'utiliser le plasmide pKW1 ou des fragments de celui-ci pour construire des vecteurs de clonage et/ou d'expression particulièrement stables.

Un autre objet de la présente invention réside donc dans des vecteurs de clonage et/ou d'expression caractérisés en ce qu'ils comprennent tout ou partie du plasmide pKW1 de K. waltii CBS 6430 représenté à la figure 1, ou d'un dérivé de celui-ci.

Un objet plus particulier de l'invention consiste en un vecteur de clonage et/ou d'expression caractérisé en ce qu'il comprend un élément génétique au moins du plasmide pKW1.

En raison du spectre d'hôte du plasmide pKW1, les vecteurs de l'invention peuvent être utilisés dans des espèces autres que l'hôte naturel K. waltii.

Ils peuvent notamment être utilisés pour la transformation d'espèces très variées, notamment d'espèces de levures.

Différents types de vecteurs ont été construits à partir de pKW1, différents au niveau de la taille du fragment provenant de pKW1, et donc des éléments fonctionnels issus de pKW1.

Un objet encore plus particulier de l'invention consiste en un vecteur de clonage et/ou d'expression caractérisé en ce qu'il comprend l'origine de répllication du plasmide pKW1.

D'autres constructions peuvent être préparées, contenant des fragments plus ou moins importants, permettant d'étudier l'influence des différents éléments

de pKW1 sur la stabilité des vecteurs, leur spécificité d'hôte, et leur efficacité pour l'expression de gènes hétérologues. En particulier, des vecteurs d'expression peuvent être élaborés à partir des différents éléments génétiques du plasmide pKW1 (origine de répllication, séquences répétées inversées, gènes de structure, régions promotrices ..), que l'on peut introduire dans des plasmides connus pour améliorer leurs performances ou leur conférer de nouvelles propriétés. De la même façon, des vecteurs peuvent être obtenus en ajoutant des éléments au plasmide pKW1, ou en remplaçant certains éléments génétiques de pKW1 par des éléments provenant d'autres plasmides. Ainsi, des vecteurs peuvent être obtenus en substituant par exemple l'origine de répllication de pKW1 par l'origine de répllication du plasmide 2 μ de S. cerevisiae ou du plasmide pKD1 de Kluyveromyces, ou par un réplicon chromosomique (ARS) d'une levure (exemple KARS de K.lactis). De la même façon, des vecteurs peuvent être obtenus en substituant le locus de stabilité de pKW1 par celui du plasmide 2 μ de S. cerevisiae ou du plasmide pKD1 de Kluyveromyces. Il peut être particulièrement intéressant de réaliser des vecteurs hybrides comprenant des éléments des plasmides pKD1 et pKW1.

Avantageusement, les vecteurs de l'invention comprennent l'intégralité du plasmide pKW1 tel que représenté à la figure 1.

Préférentiellement, les vecteurs de l'invention comprennent le plasmide pKW1 linéarisé à un site de restriction fonctionnellement neutre.

Par site de restriction fonctionnellement neutre, on entend au sens de la présente invention un site de restriction au niveau duquel il est possible d'interrompre la structure du plasmide sans altérer ses propriétés de répllication et de stabilité.

En particulier, il peut s'agir de sites présents sur le plasmide pKW1. A titre d'exemple, on peut citer notamment les sites ClaI(1); PstI(4608); ou EcoRV(3072) tels que représentés sur la figure 1.

Il peut également s'agir de sites introduits artificiellement sur le plasmide pKW1, ou rendus uniques. Dans ce cas, les sites sont préférentiellement introduits dans des régions intergéniques du plasmide, et notamment dans la région située entre les gènes B et D ou dans celle située entre le gène D et l'IR2.

Avantageusement, selon la présente invention, le plasmide pKW1 est linéarisé au niveau d'un site de restriction unique.

Un site particulièrement intéressant à cet égard est le site unique ClaI

localisé en position 1 sur la figure 1. La Demanderesse a en effet montré que ce site permettait d'utiliser le plasmide pKW1 pour construire les vecteurs de clonage et/ou d'expression, en introduisant à ce niveau, par exemple, des fragments d'ADN hétérologue, tout en maintenant la réplication stable du vecteur obtenu. Ce résultat est surprenant dans la mesure où le site ClaI est localisé dans le gène de structure B.

L'utilisation de tels sites de clonage neutres permet donc d'obtenir des vecteurs très stables, capables de se maintenir dans les cellules transformées, même en l'absence de toute pression de sélection.

Avantageusement, les vecteurs de l'invention contiennent en outre une séquence d'ADN hétérologue comprenant un gène de structure au moins, sous le contrôle de signaux permettant son expression.

Les signaux permettant l'expression du ou des gènes de structure peuvent être constitués par un ou plusieurs éléments choisis parmi les promoteurs, les terminateurs ou les signaux de sécrétion. Il est entendu que ces signaux sont choisis en fonction de l'hôte utilisé, du gène de structure et du résultat recherché. En particulier il peut être préférable dans certains cas d'utiliser un promoteur régulable, permettant le découplage entre les phases de croissance de l'hôte et d'expression du ou desdits gènes de structure. De même, l'utilisation d'un peptide signal (signal de sécrétion) peut permettre d'augmenter les taux de production de la protéine recherchée, et faciliter l'étape de purification.

Préférentiellement, les promoteurs utilisés sont dérivés de gènes de levure. D'un intérêt tout particulier sont les promoteurs dérivés de gènes glycolytiques des levures du genre Saccharomyces ou Kluyveromyces. Notamment, on peut citer les promoteurs des gènes codant pour la phosphoglycerate kinase de S.cerevisiae (PGK), la Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase (GPD), les énolases (ENO), ou les alcool-déshydrogenases (ADH). On peut également citer des promoteurs dérivés de gènes fortement exprimés tels que le gène de la lactase (LAC4) ou de la phosphatase acide (PHO5).

Par ailleurs, ces régions peuvent être modifiées par mutagenèse, par exemple pour ajouter des éléments supplémentaires de contrôle de la transcription, tels que notamment des régions UAS ("Upstream Activating Sequence").

Le gène de structure qui peut être introduit dans les vecteurs de l'invention code préférentiellement pour un polypeptide d'intérêt pharmaceutique ou agroalimentaire. A titre d'exemple, on peut citer les enzymes (tels que notamment

la superoxyde dismutase, la catalase, les amylases, les lipases, les amidases, la chymosine etc.), les dérivés sanguins (tels que la sérum-albumine, l'alpha- ou la bêta-globine, le facteur VIII, le facteur IX, le facteur van Willebrand, la fibronectine, l'alpha-1 antitrypsine etc.), l'insuline et ses variants, les lymphokines
5 [telles que les interleukines, les interférons, les facteurs de stimulation des colonies (G-CSF, GM-CSF, M-CSF...), le TNF, le TRF etc.], les facteurs de croissance (tels que l'hormone de croissance, l'érythropoïétine, le FGF, l'EGF, le PDGF, le TGF etc.), les apolipoprotéines, ou encore des polypeptides antigéniques pour la réalisation de vaccins (hépatite, cytomégalovirus, Eppstein-Barr, herpes etc.).

10 Dans un mode particulier de réalisation de l'invention le gène de structure peut être un gène résultant de la fusion de plusieurs séquences d'ADN. Il peut s'agir notamment d'un gène codant pour un polypeptide hybride, contenant par exemple une partie active associée à une partie stabilisatrice. A titre d'exemple, on peut citer les fusions entre l'albumine ou des fragments d'albumine et un récepteur ou une
15 partie d'un récepteur de virus (CD4, etc.).

Dans un autre mode de réalisation, la séquence d'ADN hétérologue peut comprendre plusieurs gènes de structure, et notamment des gènes intervenant, au niveau génétique ou biochimique, dans la biosynthèse d'un métabolite. Le métabolite peut en particulier être un antibiotique, un acide aminé ou une vitamine.

20 Dans un mode particulier de réalisation, les vecteurs de l'invention contiennent en outre :

- un réplicon E.coli et/ou
- au moins un marqueur de sélection.

Ces éléments permettent de manipuler de manière beaucoup plus aisée les
25 vecteurs de l'invention.

Un autre objet de l'invention concerne les cellules recombinées contenant un vecteur tel que défini ci-avant.

Les cellules recombinées sont préférentiellement choisies parmi les levures.

30 La Demanderesse a montré que les vecteurs de l'invention pouvaient en effet être utilisés aussi bien dans K.waltii (l'hôte naturel de pKW1) que dans des levures d'espèces ou même de genres différents. Notamment, ils peuvent être utilisés dans d'autres Kluyveromyces ou dans Saccharomyces. Par ailleurs, lorsque la souche K. waltii CBS6430 est utilisée comme cellule hôte, des recombinaisons

homologues entre les vecteurs de l'invention et le plasmide pKW1 résident peuvent affecter la stabilité des vecteurs, et ainsi diminuer les performances du couple hôte/vecteur. Afin d'améliorer encore la stabilité des vecteurs de l'invention dans un tel couple hôte/vecteur, la demanderesse a préparé une souche K. waltii pKW1⁻ (KW18). Cette souche permet d'optimiser l'utilisation industrielle des vecteurs de l'invention (voir exemple 4).

Différentes techniques peuvent être utilisées pour introduire les vecteurs de l'invention dans les cellules hôtes. En particulier, la transformation (Bianchi et al., Curr. Genet. 12 (1978) 185) et l'électroporation (Delorme, Appl. Environ. Microbiol. 155 (1989) 2242) donnent de bons résultats. Il est clair toutefois que l'invention n'est pas limitée à une technique particulière.

Un objet de l'invention réside également dans un procédé de préparation d'un polypeptide selon lequel on cultive une cellule recombinée telle que définie plus haut et on récupère le polypeptide produit. Plus particulièrement, le procédé de l'invention permet la production de protéines d'intérêt pharmaceutique ou agroalimentaire, telles que celles indiquées ci-avant. Plus spécifiquement, le procédé de l'invention est adapté à la production d'albumine humaine et de ses variants ou précurseurs.

Dans le cas où les gènes de structure interviennent dans la biosynthèse d'un métabolite, les cellules recombinées peuvent également être utilisées directement dans un procédé de bioconversion.

D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

25 LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : Carte de restriction du plasmide pKW1. Les séquences répétées inversées ainsi que les gènes de structure A-D sont indiqués. Les positions indiquées pour les sites de restriction correspondent au premier nucléotide reconnu par l'enzyme.

Figure 2 : Etude des phases ouvertes du plasmide pKW1. Les éléments génétiques indiqués sont localisés aux positions suivantes par rapport à la séquence présentée figure 3 : Gène A : nucléotides 1454 à 2755 ; Gène B : nucléotides 4948 à 54 ; Gène C : nucléotides 389 à 1309 sur le brin complémentaire ; Gène D : nucléotides

3444 à 4313 sur le brin complémentaire ; IR1 : nucléotides 53 à 368 ; IR2 : nucléotides 2713 à 3028.

Figure 3 : Séquence nucléotidique du plasmide pKW1. La séquence représentée correspond à la forme B du plasmide. La position 1 correspond au premier
5 nucléotide de la séquence reconnue par l'enzyme ClaI. Le plasmide pKW1 a été fragmenté par des enzymes de restriction et les fragments ont été clonés dans pTZ18R (Pharmacia). Les séquences des segments clonés ont été déterminées par la méthode de Sanger sur les 2 brins.

Figure 4 : Cartes de restriction des plasmides navettes YIP5 et pKan21. Ap : Gène de résistance à l'ampicilline ; Tc : Gène de résistance à la tétracycline ; Km : Gène de résistance à la kanamycine (G418) ; LacZ : Gène de structure de la β -galactosidase.
10

Figure 5 : Stratégie de construction des vecteurs pBNA1, pNEA2, pBNB1/A3, pNEB1, pXXY2 et pXXK3. Voir aussi tableau 1.

15 Figure 6 : Carte de restriction du vecteur pXXK3.

Figure 7 : Stratégie de construction des vecteurs pKWC11, pKWS1 et pKWS14.

Figure 8 : Etude de la stabilité des vecteurs pKWC11 et pXXK3 dans la souche K.waltii KW18. Dans chaque cas, un clone transformé a été cultivé en milieu YPG non sélectif pendant le nombre de générations indiqué, puis des aliquots de culture
20 ont été étalés sur boîtes de milieu YPG gélosé avec et sans G418, afin de déterminer le nombre total des cellules et le nombre de cellules résistant à G418. La stabilité correspond au % de cellules résistantes.

Figure 9 : Stratégie de construction du vecteur d'expression pXPHO5. Abréviations : P = promoteur, T = terminateur, ss = signal de sécrétion, CIP = Calf
25 Intestinal Phosphatase, Km = kanamycine, E = EcoRI, H = HindIII, S = Sall, B = BamHI, Sm = SmaI.

Figure 10 : Cartes de restriction des vecteurs pXKN18 et pXPHO5. Légende : voir figure 9.

Figure 11 : Détection immunologique de l'IL18 produite par K.waltii. Les marqueurs de poids moléculaire (KDa) sont indiqués à gauche. Puits 1 : IL-18 de
30 référence (100 ng) ; Puits 2 : Surnageant de culture du transformant pXKN18 (sans cassette IL-18) ; Puits 3 : Surnageant de culture du transformant pXPHO5 traité par l'endo-N- acetylglucosamidase H ; Puits 4 et 5 : Surnageants des cultures des transformants pXPHO5 en milieu LPi et HPi respectivement.

Figure 12 : Stratégie de construction du plasmide pYG65.

Figure 13 : Stratégie de construction du plasmide pYG70.

Figure 14 : Stratégie de construction du plasmide pYG141. *aph* : gène codant pour l'aminoglycoside 3'-phosphotransférase, conférant la résistance à la kanamycine;

5 *bla* : gène codant pour la β -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline.

Figure 15 : Stratégie de construction du plasmide pYG142.

Tableaux 1 et 2 : Composition de vecteurs dérivés de pKW1 selon l'invention. (*) Sites de clonage.

10 Tableaux 3, 4 et 5 : Transformation par des vecteurs de l'invention respectivement de *S.cerevisiae*, *K.waltii* et de différentes souches de *Kluyveromyces*. La stabilité des transformants est exprimée par le pourcentage de cellules Ura+ après 10 générations de croissance dans le milieu non-sélectif YPD. Les souches isonucléaires *K.waltii* pKW1⁺ et pKW1⁻ sont CBS 6430 et KW18 respectivement.

TECHNIQUES GENERALES DE CLONAGE

15 Les méthodes classiques de biologie moléculaire telles que la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium - bromure d'éthidium, la digestion par les enzymes de restriction, l'électrophorèse sur gel, l'électroélution des fragments d'ADN à partir de gels d'agarose, la transformation dans *E.coli*, etc, sont décrites dans la littérature (Maniatis et al., "Molecular Cloning : a
20 Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986 ; Ausubel et al., (eds.), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York 1987).

La mutagénèse dirigée in vitro par oligodésoxynucléotides est effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. (Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-
25 8764) en utilisant le kit distribué par Amersham. Le séquençage de nucléotides est réalisé selon la technique des didéoxy décrite par Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467). L'amplification enzymatique de fragments d'ADN spécifiques est effectuée par réaction de PCR ("Polymerase-catalyzed Chain
30 Reaction") dans les conditions décrites par Mullis et Faloona (Meth. Enzym., 155 (1987) 335-350) et Saiki et al (Science 230 (1985) 1350-1354), en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) en suivant les recommandations du fabricant.

EXEMPLES

1) Isolement et purification de pKW1

La souche CBS 6430 est cultivée dans 2 litres de milieu YPG (Yeast extract 1 %, Bactopeptone 1 %, Glucose 2 %) avec agitation à 26°C pendant environ 18 heures. Les cellules en phase stationnaire précoce sont récoltées par centrifugation. On obtient habituellement 13 à 15 grammes de masse cellulaire par litre. Les cellules sont lavées avec 150 ml de sorbitol 1M contenant 30 mg de Zymolyase 20T (Kirin Breweries Co., Tokyo). Après incubation à 30°C pendant 1 heure, on ajoute à la suspension de protoplastes 5 ml de sodium dodecylsulfate à 10 % et 5 ml de EDTA à 0,5M, pH 7,0. Le mélange est immédiatement agité vigoureusement, et incubé à 50°C pendant 1 à 2 heures. On ajoute au lysat l'acétate de potassium à la concentration finale de 1M et le mélange est maintenu dans la glace pendant 2 heures. Les précipités formés sont éliminés par centrifugation (Sorvall SS34, 15 000 tpm, 30 minutes). Le surnageant auquel 2 volumes d'éthanol à 95 % sont ajoutés est refroidi dans la glace afin de précipiter les acides nucléiques. Les précipités sont collectés par centrifugation, lavés avec l'éthanol à 70 %, séchés sous vide, et enfin dissouts dans 40 ml de 5 x TE (1x TE est Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8). Après addition de 40 g de CsCl et 5 ml de bromure d'éthidium (solution stock de 10 mg/ml), le mélange est centrifugé à 60 000 tpm pendant 6 heures (Beckman, rotor 60 Ti). La bande fluorescente de l'ADN plasmidique se trouve au-dessous de la bande majeure d'ADN chromosomique. L'ADN du plasmide est collecté et soumis au second cycle de centrifugation dans CsCl/bromure d'éthidium. L'ADN plasmidique collecté est mélangé avec un volume d'isopropanol préalablement équilibré avec CsCl 4M pour éliminer le bromure d'éthidium. Après plusieurs extractions par l'isopropanol, la solution d'ADN est dialysée contre 1 x TE. Le volume de la solution peut être réduit par dialyse contre le polyéthylène-glycol 6 000 en paillettes.

2) Séquençage et études d'homologies

Le plasmide pKW1 a été séquencé en utilisant la méthode décrite par Sanger et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467). La séquence complète est indiquée sur la figure 3.

L'absence d'homologie entre cette séquence et celle de plasmides connus a

été déterminée par des expériences d'hybridations moléculaires : pKW1 est marqué au ^{32}P , et hybridé avec les plasmides suivants, préalablement immobilisés sur un filtre de nitrocellulose :

- plasmide 2 μ de *S. cerevisiae*,
- 5 - pSR1, pSB3 et pSB4 de *Z. rouxii*,
- pSB1 et pSB2 de *Z. bailii*, et
- pKD1 de *K. drosophilae*.

L'hybridation a été réalisée dans des conditions de stringence modérée (0,6 M Na⁺, 65°C, 18 heures); aucun des plasmides n'a donné un signal positif d'hybridation.

Les autres plasmides circulaires (pSB1, pSB4) dont les séquences n'ont pas encore été décrites, sont également différents de pKW1, par la taille moléculaire, par la longueur des répétitions inverses et par leurs espèces hôtes.

3) Construction de vecteurs de clonage dérivés de pKW1.

Deux types de molécules recombinées ont été construits à partir de pKW1.

3.1. Dans le premier type, différents fragments de pKW1 (correspondant par exemple aux éléments génétiques de pKW1) ont été introduits dans des vecteurs navette, et notamment dans les vecteurs YIp5 (Struhl et al., Proc. Nat. Acad. Sci USA 76 (1979) 1035) et pKan21, représentés sur la figure 4.

Le plasmide pKan21 a été construit par insertion du gène *aph* (Genblock, Pharmacia) conférant la résistance à la kanamycine (G418) sous forme d'un fragment AccI de 1,25 kpb, dans le site NarI du plasmide pUC19 (Viera et Messing, Gene 19 (1982) 259). pKan21 contient donc, en plus de *aph*, le gène *bla* conférant la résistance à l'ampicilline et l'origine de réplication de ColE1 permettant la réplication dans *E. Coli*. Les levures transformées par les vecteurs dérivés de pKan21 peuvent être détectées par leur croissance sur milieu contenant 200 $\mu\text{g/ml}$ de généticine (G418).

Le plasmide YIp5 est un dérivé du plasmide pBR322 dans lequel le gène *URA3* de *S. cerevisiae* a été inséré comme marqueur de sélection. La levure transformée par les dérivés de YIp5 est détectée par sa croissance sur un milieu sans uracile. Dans ce dernier cas, la levure hôte est une auxotrophe déficiente en orotidine-monophosphate carboxylase de la voie de synthèse de l'uracile.

Les vecteurs de ce premier type sont pBNA1, pNEA2, pBNB1/A3, pNEB1, pXXY2 et pXXK3 (tableau 1 et figure 4).

- Vecteur pBNA1

pKW1 a été digéré par BglII et NheI (Cf figure 5) et les fragments d'ADN
5 sont séparés par électrophorèse. Le fragment de 2,4 kpb est récupéré et inséré par
ligation entre les sites uniques BamHI et NheI dans le gène de résistance à la
tétracycline du plasmide YIp5 (Yanish-Peron et al., Gene 33, 1985, 103-119),
celui-ci étant préalablement digéré par BamHI et NheI et repurifié. Les extrémités
BglII et BamHI sont compatibles pour ligation spécifique. E. coli transformé par le
10 mélange de ligation est sélectionné sur le milieu LB gélosé contenant l'ampicilline.
L'insertion est vérifiée par la réplique des transformants sur le milieu LB gélosé
contenant la tétracycline, ceux-ci étant sensibles à cet antibiotique. La structure du
plasmide est vérifiée par extraction de l'ADN à partir de transformants individuels
et son analyse par les enzymes de restriction. A titre d'exemple, le plasmide pBNA1
15 digéré par PstI produit 3 fragments de 3,28, 3,15 et 1,36 kpb : la double digestion
PstI/NheI donne 4 fragments de 3,15, 2,3, 1,36 et 1,0 kpb.

- Vecteur pNEA2

Le fragment NheI-EcoRI de 2,0 de pKW1 (Cf figure 5) est isolé et inséré
entre les deux sites uniques NheI et EcoRI dans le gène de résistance à la
20 tétracycline de YIp5, celui-ci étant préalablement digéré par ces deux enzymes. Le
produit de ligation est introduit dans E. coli, et les transformants résistants à
l'ampicilline et sensibles à la tétracycline sont isolés. Le plasmide est isolé comme
dans le cas de pBNA1 à partir de l'un de ces transformants. La structure du
plasmide recombiné obtenu est vérifiée par restriction. A titre d'exemple, la
25 digestion par PstI produit 2 fragments de 4,35 et 3,15 kpb; la double digestion par
PstI/XhoI produit 4 fragments de 3,15, 1,8, 1,75 et 0,7 kpb.

- Vecteur pXXY2

Le fragment XhoI-XbaI de 545 pb de pKW1 (Cf figure 5) est isolé et
inséré entre les sites uniques Sall-NheI dans le gène de résistance à la tétracycline
30 du plasmide YIp5. Les extrémités XhoI et Sall, d'une part, et XbaI et NheI, d'autre
part, sont compatibles pour ligation spécifique. Le produit de ligation est introduit
dans E. coli, et le plasmide recombiné est isolé comme dans le cas de pBNA1. La

structure du plasmide obtenu est vérifiée par restriction. A titre d'exemple, la digestion par EcoRI + NruI produit deux fragments de 4,5 et 0,96 kpb.

- Vecteur pXXK3

Le fragment XhoI-XbaI de 545 pb de pKW1 (Cf figure 5) est isolé et
5 inséré entre les sites uniques SalI-XbaI (polylinker au N-terminal de LacZ) du
plasmide pKan21. Le mélange de ligation est introduit dans *E.coli*, et les trans-
formants, étalés sur le milieu LB contenant X-gal et IPTG, sont isolés comme
colonies blanches parmi les bleues. Répliquées sur le milieu LB contenant la
kanamycine, elles croissent bien. Ces colonies sont individuellement analysées pour
10 leur contenu en plasmide. Le plasmide obtenu à partir de l'un des transformants
présente la structure montrée dans la figure 6, vérifiée par restriction. A titre
d'exemple, la digestion par BamHI + PstI produit quatre fragments 2,5, 1,3, 0,55 et
0,19 kpb.

- Vecteur pBNB1/A3

15 Le fragment BglII-NheI de 1,9 kpb de pKW1 (Cf figure 5) est isolé et
inséré entre les sites BamHI-NheI de YIp5. Le plasmide recombiné est isolé
comme dans le cas de pBNA1. La structure du plasmide est vérifiée par restriction.
A titre d'exemple, la digestion par PstI produit 3 fragments de 3,15, 2,8 et 1,36 kpb
; la double digestion par PstI/NheI produit 4 fragments de 3,15, 1,8, 1,36 et 1,0
20 kpb.

- Vecteur pNEB1

Le fragment NheI-EcoRI de 2,5 kpb de pKW1 (Cf figure 5) est isolé et
inséré entre les sites NheI-EcoRI de YIp5. Le plasmide recombiné est isolé comme
dans le cas de pBNA1. La structure du plasmide est vérifiée par restriction. A titre
25 d'exemple, la digestion par PstI produit 2 fragments de 4,65 et 3,15 kpb ; la double
digestion par PstI/XhoI produit 3 fragments de 3,15, 2,9 et 1,75 kpb.

3.2. Le deuxième type de molécules recombinées contient la totalité de la
séquence de pKW1. Pour obtenir ces vecteurs, pKW1 est linéalisé par coupure
unique à un site de restriction, permettant d'introduire des segments d'ADN
30 hétérologue. De tels segments peuvent contenir des gènes de structure, inclus par
exemple dans des cassettes d'expression, et/ou des vecteurs navettes entiers, tels que

notamment pKan21 ou YIp5 (figure 4).

Les exemples de ce type de vecteurs sont pKWC11, pKWS1 et pKWS14 (tableau 2 et figure 7).

- vecteur pKWS14

5 L'ADN de pKW1 a été digéré par l'enzyme de restriction Sall. Le plasmide pKan21, décrit plus haut, est digéré aussi par Sall (le site unique Sall est localisé dans le multisite de clonage présent dans le gène LacZ). Les deux plas-
midés sont ligaturés par l'ADN-ligase. Le mélange de ligation est utilisé pour la
transformation de E. coli JM83 comme dans le cas précédent. La suspension des
10 cellules transformées est étalée sur LB gélosé contenant X-gal et IPTG. Les colonies blanches, parmi les bleues, sont récupérées individuellement. Elles sont résistantes à l'ampicilline et à la kanamycine. Leur contenu en plasmide est analysé sur les mini-préparations d'ADN comme précédemment. Le plasmide, pKWS14, isolé à partir de l'un des transformants, contient la forme A du plasmide pKW1 et
15 possède la structure montrée dans la Figure 7. Elle est vérifiée par restriction. A titre d'exemple, la digestion par BamHI produit 3 fragments de 5,6, 2,6 et 1,2 kpb.

- Vecteur pKWC11

Le plasmide pKW1 est digéré par ClaI. Le plasmide pKan21 est digéré par
AccI. Ils sont repurifiés par traitement au phénol et précipitation par éthanol. Les
20 ADN des deux plasmides sont mélangés en quantités approximativement égales et soumis à la réaction de ligation par l'ADN-ligase pendant une nuit. Le produit de ligation est amplifié dans E. coli. Les colonies des transformants sont blanches sur le milieu LB contenant Xgal et IPTG. Elles sont résistantes à la kanamycine et l'ampicilline sur le milieu contenant l'un ou l'autre de ces antibiotiques. Le
25 plasmide, pKWC11, isolé à partir de l'un des transformants, contient la forme A du plasmide pKW1 et possède la structure montrée dans la Figure 7. Elle est vérifiée par restriction. A titre d'exemple, la digestion du plasmide par BamHI produit 3 fragments de 5,6, 2,9 et 0,9 kpb.

- Vecteur pKWS1

30 Le plasmide pKW1 et le plasmide YIp5 sont digérés par Sall. Le mélange est repurifié et soumis à la réaction de ligation. Le produit de ligation est introduit dans E. coli. Des transformants résistants à l'ampicilline et sensibles à la

tétracycline, sont obtenus. Le plasmide, pKWS1, isolé à partir de l'un d'entre eux, contient la forme A du plasmide pKW1 et possède la structure montrée dans la Figure 7. A titre d'exemple, la digestion du plasmide par EcoRI donne deux fragments de 8,3 et 2,7 kpb.

5 4) Construction d'une souche CBS 6430 pKW1

K.waltii CBS 6430 a d'abord été transformée par le plasmide recombinant pKWS14 (tableau 2 et figure 7). La méthode de transformation utilisée est essentiellement celle décrite par Chen et Fukuhara (Gene 69, 181 (1988)) utilisant les protoplastes. Les transformants obtenus sont maintenus pendant 75 générations
10 sur milieu YPD-agar 1 mg/ml G418 (Milieu YPD : extrait de levure 10 g/l ; peptone 20 g/l ; glucose 20 g/l). Ils sont ensuite transférés sur milieu YPD liquide sans antibiotique et maintenus pendant 10 générations.

Dans ces conditions (sans pression sélective), le plasmide pKWS14 est progressivement perdu. Les colonies sensibles à G418 qui apparaissent sont
15 prélevées et testées individuellement pour la présence des plasmides. Le test consiste en extraction de l'ADN cellulaire, suivie d'une électrophorèse de ces ADN sur un gel d'agarose. La présence de plasmides est révélée par coloration au bromure d'éthidium. Parmi les colonies qui sont devenues sensibles à G418, 25 % se sont révélées démunies de tout plasmide. Une de ces colonies a été gardée
20 comme souche de K. waltii dépourvue de plasmide pKW1 et désignée KW18.

5) Transformation de différentes levures

5.1. Transformation de S.cerevisiae

Parmi les différents vecteurs décrits dans les tableaux 1 et 2 et aux figures 4 et 5, certains de ceux contenant le marqueur URA3 ont été utilisés pour
25 transformer une souche auxotrophe ura3 de S.cerevisiae (la souche S150--2B : Mat a, ura3, leu2, trp1, his3, 2μ).

La méthode de transformation est essentiellement celle décrite par Sherman et al (Yeast Genetics, Cold Spring Harbor, NY, 1986).

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 3. Ils montrent que les
30 vecteurs de l'invention sont capables de transformer les levures du genre Saccharomyces.

5.2. Transformation de K.waltii

La transformation de K.waltii a été réalisée avec des vecteurs portant le marqueur de résistance à la kanamycine.

La méthode de transformation utilisée est essentiellement celle décrite par Chen et Fukuhara (Gene 69 (1988) 181) utilisant les protoplastes. Il est clair que toute autre technique permettant d'introduire un fragment d'ADN dans un microorganisme peut être utilisée.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4.

Ils montrent que les vecteurs de l'invention sont capables de transformer avec une fréquence élevée la levure K.waltii.

Par ailleurs, l'étude de stabilité décrite dans la figure 8 montre que des vecteurs peuvent être obtenus à partir de pKW1, présentant une stabilité de 100 % après 50 générations de croissance dans un milieu non sélectif. Ceci est parfaitement illustré par le vecteur pKWC11. Cette étude montre également qu'il est préférable, pour obtenir une stabilité relativement élevée, d'utiliser les vecteurs ne comportant que l'origine de répllication du plasmide pKW1 dans des cellules hôtes possédant un plasmide pKW1 résident.

5.3. Transformation d'autres levures

Le vecteur pKWC11, hautement stable et autonome dans K.waltii, a été utilisé pour tester la transformabilité de différentes espèces de levures, et notamment celles appartenant au genre Kluyveromyces.

Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

La présence du vecteur pKWC11 dans les transformants a été vérifiée par électrophorèse.

L'ensemble de ces résultats montrent que l'étendue des espèces hôtes des vecteurs de l'invention peut être très grande, dépassant le genre Kluyveromyces.

6) Utilisation des vecteurs de l'invention pour la production de protéines hétérologues

6.1. Interleukine-18 :

6.1.1. Construction d'un vecteur d'expression et de sécrétion de l'IL-18 dérivé de pKW1 (figures 9 et 10).

- Le vecteur pXXK3 (tableau 1, figure 6) est linéarisé par EcoRI et les extrémités sont comblées avec le fragment Klenow de l'ADN polymérase I de E.coli. Un "linker" synthétique (5'-GCGGCCGC-3') formant un site de restriction reconnu par l'enzyme NotI est ajouté au moyen de la ligase T4, et le vecteur ainsi obtenu (pXKN18) est purifié après son amplification chez E.coli (figure 10).

- Une cassette d'expression de l'IL-18 est réalisée, composée (a) du promoteur régulé PHO5 provenant de S. cerevisiae (Bajwa et al., Nucl. Acid. Res. 12, (1984) 7721-7739), (b) du gène de l'IL-18 humaine (Jung et al., Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 139 (1988) 129-146) précédé (c) d'une séquence synthétique correspondant à la séquence signal de la toxine killer de pGKL1 de K.lactis (région pré du gène de la sous-unité alpha) (Stark et Boyd, EMBO J. 5, (1986) 1995-2002), et (d) du terminateur PHO5. La cassette d'expression a été isolée à partir du vecteur pSPHO5-IL14 dont la construction est décrite dans le brevet EP 361991. La cassette a été réalisée de la manière suivante : A l'extrémité 5' du gène codant pour la partie mature de l'IL-18 est insérée la séquence synthétique suivante, sous forme d'un fragment EcoRI :

MetAsnIlePheTyrIlePheLeuPheLeuLeuSerPheValGlnGlyLysArg
 5'-AATTATGAATATATTTTACATATTTTGTGTTTGTCTGTCATTTCGTTCAAGGTAAAAG-3'
 3'-TACTTATATAAAATGTATAAAAAACAAAACGACAGTAAGCAAGTTCATTTTCTTAA-5'

Les derniers codons ajoutés (Lys et Arg) forment un site de coupure potentiel reconnu par l'endopeptidase Kex1 de K.lactis (Tanguy-Rougeau et al ; FEBS Lett. 234 (1988) 464). Cette séquence a été fusionnée au gène de l'IL-18 par le site EcoRI, formant la jonction suivante :

Gly Lys Arg Ile His Met Ala
 5'....GGT AAA AGA ATT CAT ATG GCA3'

L'alanine (GCA) correspond au premier acide aminé de l'IL-18 mature. Arg-Ile-His-Met correspond à un "linker" EcoRI-NdeI introduit pour faciliter le clonage (Cf EP 361 991).

L'ensemble de la cassette est mis sous forme d'un fragment NotI par addition d'un linker correspondant (5'-GCGGCCGC-3').

- La cassette de sécrétion de l'IL-18 est insérée, au site NotI, dans

pXKN18. Le vecteur résultant est appelé pXPHO5 (figure 10).

6.1.2. La souche K.waltii CBS 6430 est transformée par le vecteur pXPHO5, dans les conditions décrites dans l'exemple 5.2.

6.1.3. Expression de l'IL-18:

5 Les cellules transformées sont cultivées à 28°C, en absence de G418, dans le milieu liquide LPi (à faible teneur en phosphate minéral) et le milieu HPi (à haute teneur en phosphate), préparés selon Chen et Fukuhara (Gene 62 (1988) 181-192), pendant 4 jours. 50 ml de culture sont centrifugés et les surnageants filtrés sur membrane Millipore (0,22 µm). Les protéines sont précipitées par addition
10 d'éthanol à la concentration finale de 60 %. Les précipités sont dissous dans 2 ml de tampon de Laemmli (Nature 227 (1970) 680-685) et 20 µl d'échantillons sont utilisés pour l'analyse SDS-PAGE selon Laemmli (document précité). Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une feuille de nitrocellulose, et
15 traitées par un antiserum polyclonal de lapin anti IL-18 humaine. Le Blot est ensuite traité avec un 2ème anticorps polyclonal anti-lapin biotinylé (Vectastain ABC ImmunoPeroxidase Kit, Vector Laboratories). Le complexe antigène-anticorps est révélé selon le protocole du fournisseur.

La figure 11 montre qu'une protéine de poids moléculaire apparent de 21 kDa est sécrétée par la levure transformée par pXPHO5. La protéine est spéci-
20 fiquement reconnue par l'antisérum anti-IL-18. Cette protéine n'est pas synthétisée par la levure transformée par le vecteur de contrôle pXKN18 (sans cassette IL-18). La protéine sécrétée correspond à la forme glycosylé de l'IL-18, ce qui est démontré par la réduction du PM apparent après traitement par l'enzyme endo-N-acétylglucosamidase H (figure 11 piste 3). Ce couple hôte/vecteur
25 K.waltii/pXPHO5, encore non-optimisé, sécrète approximativement 5 mg d'IL-18 par litre de culture. Le niveau de la sécrétion d'IL-18 par K.waltii est plus élevé dans le milieu LPi que dans le milieu HPi, ce qui suggère que l'activité du promoteur PHO5 est régulée par le phosphate dans K.waltii comme dans S.cerevisiae.

6.2. Sérum-albumine humaine :

6.2.1. Construction du plasmide pYG140 (figures 12-14).

Un plasmide a été construit comprenant:

- un réplicon E.coli,
- 5 - le gène aph sous contrôle du promoteur k1 de la toxine killer de K.lactis (EP361911) dans lequel le site HindIII a été éliminé par mutagenèse dirigée, et
- le gène bla, conférant la résistance à l'ampicilline.

Le gène aph sous contrôle du promoteur k1 est isolé à partir du plasmide pKan707 (EP361991) sous forme d'un fragment PstI, qui est cloné dans le site équivalent du phage M13mp7. Le plasmide résultant est appelé pYG64 (figure 12).
10 Le site HindIII présent dans ce gène a été détruit par mutagenèse dirigée selon la méthode décrite par Taylor et al. (Nucl. Acid. Res. 13 (1985) 8749). Le plasmide résultant est appelé pYG65. L'oligodéoxynucléotide ayant servi pour la mutagenèse a la séquence suivante : 5'-GAAATGCATAAGCTCTTGCCATTCTCACCG-3', et
15 a permis de transformer le triplet CTT codant pour la leucine 185 en CTC. Pour construire le plasmide pYG70, la partie contenant le réplicon bactérien du vecteur pKan707 a été isolée par digestion avec l'enzyme EcoRI et recircularisation avec la T4 DNA ligase pour obtenir pYG69. Le fragment PstI présent dans ce dernier vecteur contenant le gène aph a ensuite été remplacé par le fragment équivalent muté provenant de pYG65. Le plasmide résultant est appelé pYG70 (figure 13).
20

Ce plasmide est ensuite digéré par EcoRI et reliqué en présence d'un adaptateur EcoRI-NarI-EcoRI contenant la séquence suivante : 5'-AATTCGGCGCCG-3'.

La plasmide obtenu est appelé pYG140 (figure 14).

25 6.2.2. Introduction d'une cassette d'expression de l'albumine (figure 14).

Le gène codant pour la préproSAH sous contrôle du promoteur et du terminateur du gène PGK de S.cerevisiae a été isolé sous forme d'un fragment Sall-SacI à partir du vecteur d'expression pYG19 (EP361991). Ce fragment a été introduit dans les sites correspondant du plasmide pYG140 pour générer le plasmide pYG141.
30

6.2.3. Construction du vecteur d'expression pYG142 (figure 15).

Les plasmides pYG141 et pKW1 sont digérés respectivement par les enzymes *NarI* et *ClaI*. Après ligation, 4 plasmides recombinants sont obtenus, en raison de l'existence des 2 formes A et B de pKW1, et de l'orientation de la partie

5 pKW1 par rapport à la partie pYG141.

La figure 15 décrit la carte de restriction d'un de ces 4 plasmides : pYG142, contenant la forme B de pKW1.

Les autres plasmides sont appelés pYG143, pYG144 et pYG145.

10 Un échantillon de la souche *K.lactis* CBS 6430 a été déposé au CBS à Baarn (Pays-Bas) selon les conditions du Traité de Budapest le 4 juin 1991 sous le numéro CBS 290.91.

TABLEAU 1

VECTEURS	FRAGMENT DE PKW1	VECTEUR NAVETTE	MARQUEUR
pBNA1	BglII-NheI 2,4 Kb	YIp5	<u>URA3</u>
pNEA2	NheI-EcoRI 2,0 kb	* BamHI-NheI YIp5	<u>URA3</u>
pXXY2	XhoI-XbaI 0,55 kb	NheI-EcoRI YIp5	<u>URA3</u>
pXXK3	XhoI-XbaI 0,55 kb	Sall-NheI pKan21	<u>Kan^R</u>
pBNB1/A3	BglIII-NheI 1,9 kb	Sall-XbaI YIp5	<u>URA3</u>
pNEB1	NheI-EcoRI 2,5 kb	BamHI-NheI YIp5 NheI-EcoRI	<u>URA3</u>

TABLEAU 2

VECTEURS	SITE DE LINEARISATION DE PKW1	VECTEUR NAVETTE	MARQUEURS
pKWS14	Sall	pKan21 * (Sall)	Kan ^R
pKWC11	ClaI	pKan21 (AccI)	Kan ^R
pKWS1	Sall	YIp5 (Sall)	URA3

TABLEAU 3

Transformation de Saccharomyces cerevisiae par des vecteurs dérivés de pKW1.

VECTEURS	Transformants Ura+ par µg d'ADN
pKWS1	4 400
pBNA1	1 200
pBNB1/A3	7 600
pXXY2	4 000
pSK1	4 500

TABLEAU 4

Transformation de Kluyveromyces waltii par des vecteurs dérivés de pKW1.

VECTEURS	Support de répllication	Transformants G418-résistants par µg d'ADN	
		pKW1 ⁺	pKW1 ⁻
pKWC11	pKW1 total	36 000 (98 %)	8 000 (100 %)
pXXK3	XbaI-XhoI 540bp de pKW1	35 000 (49 %)	10 000 (2,8 %)
pKWS14	pKW1 total	10 000 (92 %)	8 000 (29 %)

TABLEAU 5

Transformation de levures du genre Kluyveromyces.
avec le vecteur pKWC11

Espèce	Souche	GC %	Fréquence de transformation par µg d'ADN	Stabilité des transformants (%)
K.waltii K.thermotolerans	CBS6430	45,6	2400	100
	CBS6340	46,2	4000	25

REVENDICATIONS

- 1 - Plasmide pKW1 isolé à partir de la souche K.waltii CBS6430, ou tout fragment ou dérivé de celui-ci.
- 2 - Fragment selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un
5 élément génétique.
- 3 - Plasmide caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la séquence présentée à la figure 3 ou d'un dérivé de celle-ci.
- 4 - Vecteur de clonage et/ou d'expression caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie du plasmide pKW1 de K.waltii CBS 6430 représenté à la figure 1 ou
10 d'un dérivé de celui-ci.
- 5 - Vecteur selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il comprend un élément génétique au moins du plasmide pKW1.
- 6 - Vecteur selon la revendication 5 caractérisé en ce qu'il comprend l'origine de réplication du plasmide pKW1.
- 7 - Vecteur selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il comprend
15 l'intégralité du plasmide pKW1.
- 8 - Vecteur selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la séquence présentée à la figure 3 ou d'un dérivé de celle-ci.
- 9 - Vecteur selon l'une des revendications 4, 7 ou 8 caractérisé en ce que le
20 plasmide pKW1 est linéarisé au niveau d'un site de restriction fonctionnellement neutre.
- 10 - Vecteur selon la revendication 9 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un site de restriction présent sur le plasmide pKW1, ou introduit artificiellement sur celui-ci.
- 11 - Vecteur selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un site
25 de restriction introduit artificiellement dans une région intergénique, et de

préférence dans la région située entre les gènes B et D ou dans la région située entre le gène D et l'IR2.

12 - Vecteur selon la revendication 10 caractérisé en ce que le plasmide pKW1 est linéarisé au niveau des sites ClaI(1), PstI(4608) ou EcoRV(3072), les positions étant données par rapport à la figure 3.

13 - Vecteur selon l'une quelconque des revendications 4 à 12 caractérisé en ce qu'il contient en outre une séquence d'ADN hétérologue comprenant un gène de structure au moins sous le contrôle de signaux permettant son expression.

14 - Vecteur selon la revendication 13 caractérisé en ce que les signaux d'expression sont constitués par un ou plusieurs éléments choisis parmi les promoteurs, les terminateurs, et les signaux de sécrétion.

15 - Vecteur selon la revendication 14 caractérisé en ce que les promoteurs sont régulables.

16 - Vecteur selon la revendication 14 caractérisé en ce que les promoteurs dérivent de gènes de levure, et préférentiellement de gènes glycolytiques de levure.

17 - Vecteur selon la revendication 13 caractérisé en ce que le gène de structure code pour un polypeptide d'intérêt pharmaceutique ou agroalimentaire.

18 - Vecteur selon la revendication 13 caractérisé en ce que le gène de structure code pour une protéine hybride.

19 - Vecteur selon la revendication 13 caractérisé en ce que le ou les gènes de structure sont des gènes intervenant, au niveau génétique ou biochimique, dans la biosynthèse d'un métabolite.

20 - Vecteur selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il contient en outre un réplicon E.coli.

21 - Vecteur selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il contient en outre un marqueur de sélection au moins.

22 - Cellule recombinée contenant un vecteur selon l'une quelconque des revendications 4 à 21.

23 - Cellule selon la revendication 22 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure.

5 24 - Cellule selon la revendication 23 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure du genre Kluyveromyces ou Saccharomyces.

25 - Procédé de préparation d'un polypeptide caractérisé en ce que l'on cultive une cellule recombinée selon l'une des revendications 22 à 24 et on récupère le polypeptide produit.

10 26 - Procédé selon la revendication 25 caractérisé en ce que le polypeptide est choisi parmi les enzymes (telles que notamment la superoxide dismutase, la catalase, les amylases, les lipases, les amidases, la chymosine etc.), les dérivés sanguins (tels que la sérum-albumine, l'alpha- ou la bêta-globine, le facteur VIII, le facteur IX, le facteur van Willebrand, la fibronectine, l'alpha-1 antitrypsine etc.),
15 l'insuline et ses variants, les lymphokines [telles que les interleukines, les interférons, les facteurs de stimulation des colonies (G-CSF, GM-CSF, M-CSF...), le TNF, le TRF etc.], les facteurs de croissance (tels que l'hormone de croissance, l'érythropoïétine, le FGF, l'EGF, le PDGF, le TGF etc.), les apolipoprotéines, ou encore des polypeptides antigéniques pour la réalisation de vaccins (hépatite,
20 cytomégalovirus, Eppstein-Barr, herpes etc.).

27 - Procédé selon la revendication 26 caractérisé en ce que le polypeptide est l'albumine humaine ou un de ses variants ou précurseurs.

28 - Utilisation d'une cellule recombinée selon l'une des revendications 22 à 24 comme catalyseur dans une réaction de bioconversion.

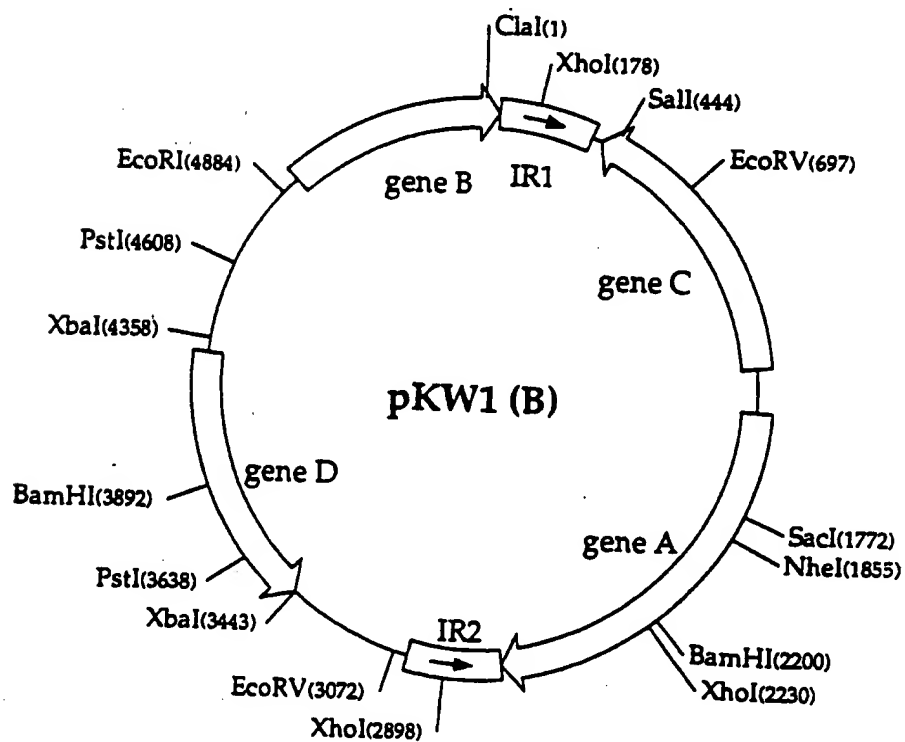
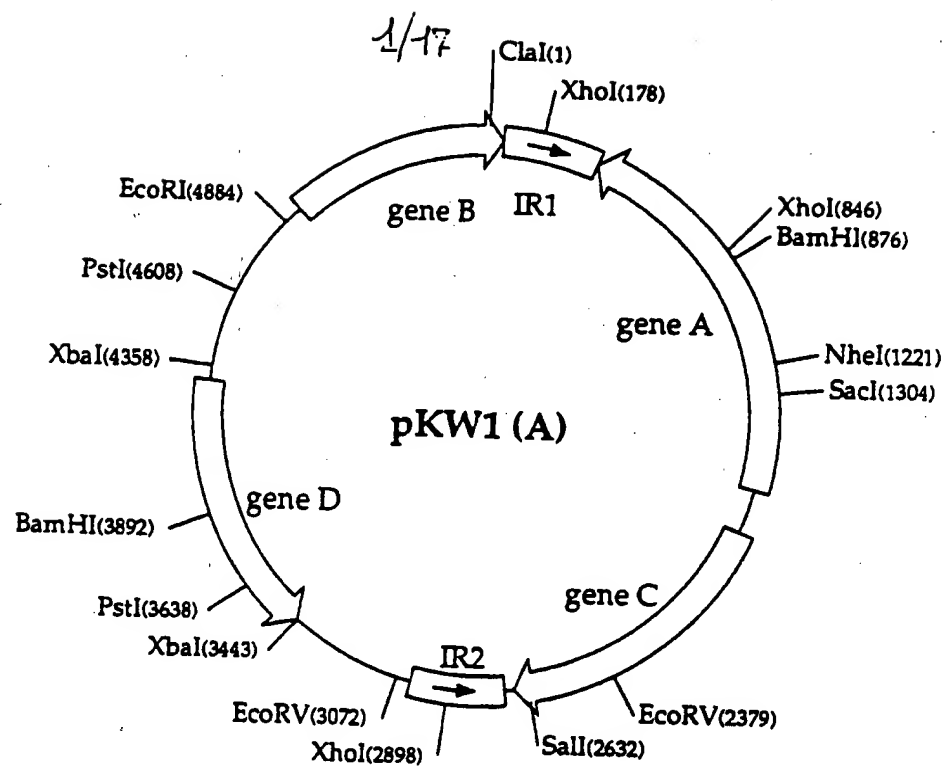


FIGURE 1

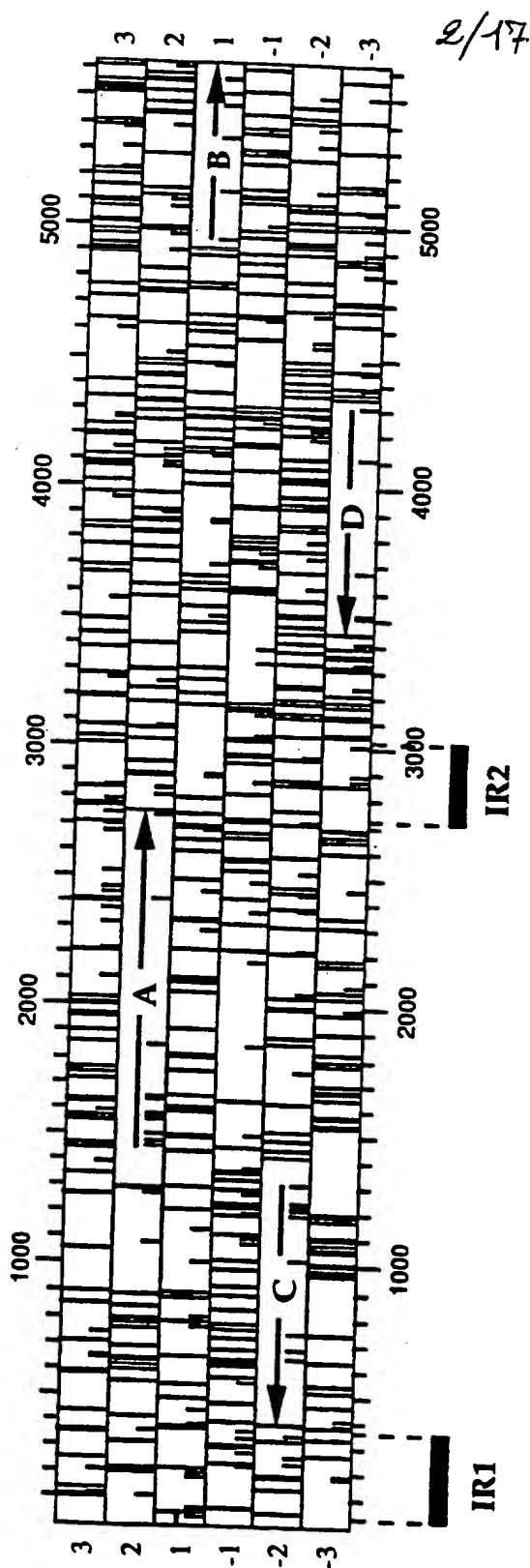


Figure 2

3/17

10	20	30	40	50	60
----	----	----	----	----	----

```

1 ATCGATTGCC AGCAACAGGG TTTTGC GCGT ATGTCTCTTG TGGATACTAT GTAAACAAAA 60
61 CAATCAATGT ACAAAGAGCA CAGCGGCCGG CAGGTGGGAG GACCCTCTGA TGAGCCGGGG 120
121 ATATGGCGCT CCCGCGCGTC TAATATCCGG ATTGGACTGG AGGAGGACCA AGGTTTCCTC 180
181 GAGGTCATGT GCCGCATCAT GAGGGACGAA AAATGGTAAG GAATAGACCA TTCCTTACCA 240
241 TTTTTCGTCG CCCGTGAGAT TTTCCCATTT CCCGTTCCCTT ACCATTTTTC GTTCCGCACG 300
301 ACCCTATCAC ATTGTATATT GAAATCTACT TCCCTTCATA CCGCTTGGCC ATCGCGTAGG 360
361 AATGAACATA TGTAGCCCCT CTAGTTCCTC ATGTTGTTCT CAATCGACCC TTCCATCGTG 420
421 AAGGGATCTC CTCTTGAGGC AATGTCGACG TTCGTACCCT CTTCTACGG GTCACGGGTT 480
481 CGTCTGTAAC ACTTCTTCTT GGTCTCCCTC GGCCTCTTTT ACTTGGCTGT GGCCTGGTAT 540
541 TTTTGAGTTC ATCGAATAGG CGCGGGTTTT CTTTACTTG AGGCCAGTCT TGAATCTCTG 600
601 AACCAGAGAG GGTAGAGAA GTTATTCTTT TTAGATCATT TAACATGTCC TTGATGTCTT 660
661 CTGGCGTTGT TTCGAAGCAC ATCAGTCCCC TTGAGCGATA TCTGTCGTAA TTTGCCAGTA 720
721 TTACGTTGTG CGCTTCTTCC ATGTTTTTCAG GGGCCACATG CTTAATGCC TGCATAAAA 780
781 CACTTCTGAC AAGTGACCA TCTGCAATG CAGGCTCGTT CGCCAATATC AATCTCTGTA 840
841 GAGGAACACC ACGATAGCTT GTTGTGCCCT TGCAGATAGT GTTCAAGAAT AGACTGAGGT 900
901 AGCCACGTAC GTCGAGCTTT ACAGACCTGG TGCCAACGCC AGAAAGAAGG GCGAAGGGGT 960
961 CCTCTTCAAT CGGAAAACGG GTCAGGCTAT CCACACGGTA CTCTCTATAT GTACTACGAG 1020
1021 TCATCGTCGT GTACTTTGCG AAGTGCAGGC CGTGGCGATT ATAGTCAATC TGGAAAGAAT 1080
1081 CCTGCTCATG TGGCTCTTTC TCCCCATTAT CCTCTTCAGA GTTCAGCGAG CCAGATGGCA 1140
1141 GCTCGGCTGG CTCTCGCAGG TACGTGGGAT CGGGCTCACC TCGATCCACC GTCATCTCAT 1200
1201 CAAGATTGCA CATAATCTGC ATCAGTCTCA ACGTCATATC GACCGCGGAA AAGGCGTCCG 1260
1261 AGTAGGAAAC ATGCAGTTTG GAAAGGTCTA ACAGCTTGAG GCAGTGCATC TTGGCCTCTC 1320
1321 TCTCTGTCAG TCTTTCTCTG TTTTGACCAA TTTTCTCAA GTGTATTACA TTTGTTTCTT 1380
1381 GGATTGCAAA AATGTTGCGA GTACTGCGTG TTCTCGTTCA AAAACAGCGT TCGTGAAAA 1440
1441 TTTAGGAGTT CAGATGCAAC GCGTAGTGCA AATGGAGGAT TCAAGTTGCA GTAACAATA 1500
1501 CATGGAACAC CAAGGATCAG TGTTGAGGA GCTTATCTCC AAAATCTTA TGAGCCTGAT 1560
1561 GGAAGAATTG ATGTCTATGC TCACTAATGA GAAGGAGTTC CAACGTGAAA GGTTCCGCTC 1620
1621 TCTCCTAGCC TACATGATAA TGGCTACTGG TGAATTGGA GAGAAAAAGC TCAGTACATT 1680
1681 TACCAAGTAT TCCCGACGGA TCAGGCAGAC GGTAGAGTTC GACAGCAACA ACCAAATCGT 1740
1741 AAGATTTGAG TACCATTTGA AGAATCCCAC AGAGCTCAAG GAGACGCTGG ACAAGGCCCT 1800
1801 TAAACCTGTC GTGTTTGA TCAAGTCCAA AAAGAAGGTT GTCTCCATGC TGGAGCTAGC 1860
1861 TCGGAAGCTC GACAAAAGGG GATCAGATTC AGCGGGTGGT ACGGTAGCTA GTGAGGTCTC 1920
1921 GAAGCTTGTG CGGGAGGAAG AAATTTGGCT TCTTCTCGTG AACGTGAAGA ATACTATCCA 1980
1981 GGAAAAGGTG CGCAAATCAT CGCTAAGAGC GGAATTGACG TATATTTTGA CAGCCTCATT 2040
2041 CTTCAATTGT TGCAGACATA GCGATCTCAG GAACGCAGAC CCCGCAACAT TTGAGCTGGT 2100
2101 GCCAAATAAG TATGTGGGCC ACGTTGTCCG GGTTTTGGTG TGCGAGACCA AGACCCGAAA 2160
2161 GCCGCGGTTT ATATACTTTT TCCCTGTCAA TACGGCCGCG GATCCTCTAG TAGCGCTTCA 2220
2221 TGATTTGTTC TCGAGCACGT TTCCTTCCAA AAAGAGTCGG ACGTCCGAAA GAAAGCAGGA 2280

```

Figure 3 (a)

4/15

2281 ACAGGAATGG CAGATCGTTC GCGACGCATC AATCAACAAC TATGACCGGT TTGTTGGTAA 2340
 2341 GCACGCTACG GAATCTGTCT TTGCCATCTT GCATGGTCCC AAATCACACT TGGGCCGGCA 2400
 2401 CTTGATGAGT TCCTACTTGG CGTATACCCA CCATGGGGAA TGGGTCTCAC CATATGGGAA 2460
 2461 TTGGTCAGCT GGGAAAGGAA CCATTGAAAG CAGCGTGGCA AGGGCCAAGT ACGCACATGT 2520
 2521 TCAAGCCGAG ATCCCAAGCG ATCTTTTCGC CTTTCTGTCT CAGTACTATC AGGAATCAAA 2580
 2581 ATCGGGCGAT TTCGAGCTTA ACGACACCAG CAAAGACCCA ACAAAGCTGG TACGGCACTC 2640
 2641 GGCTAGTCAA CTGGAAATCA ATCGAACCTA TGGTCCATGG AGTAGATTGG TTAACAAGGA 2700
 2701 TGTTTTAGGC TTTGTTTATT CCTACGCGAT GGCCAAGCGG TATGAAGGGA AGTAGATTTC 2760
 2761 AATATACAAT GTGATAGGGT CGTGCGGAAC GAAAAATGGT AAGGAACGGG AAATGGGAAA 2820
 2821 ATCTCACGGG CGACGAAAAA TGGTAAGGAA TGGTCTATT CTTACCATTT TTCGTCCCTC 2880
 2881 ATGATGCGGC ACATGACCTC GAGGAAACCT TGGTCTCTCT CCAGTCCAAT CCGGATATTA 2940
 2941 GACGCGCGGG AGCAGCCTAT CCCC GGCTCA TCAGAGGGTC CTCCCACCTG CCGGCCGCTG 3000
 3001 TGCTCTTTGT ACATTGATTG TTTTGTTTTA GTATTACCTG ACAATCATTT TATATTTTGT 3060
 3061 CAGTATTTCT TGATATCTGG CCCAAATGAA AGTACAAATA CAAGTACAAG TACAACACCT 3120
 3121 ATTCAATTGT ACCGTATCTC TATACTATTA TCCTTATTTT CTGCCTAATT AACTACTTTC 3180
 3181 TACCGGTGCG TTCTTAAAGC TGAGTAGGCA CTTACGCCCC AAGTGAATAT CGCTGGCCTC 3240
 3241 ATTATCTGTT TGTTGTATGG CCAATGAAAC TCCAACCGAT TTGATCCACT TGCAAGGACC 3300
 3301 GTAGGATAGA CTTATTTTTA CCATCCCATT ATCTGTGCAG TGGACACCTC TGTTTATCTT 3360
 3361 TACCCGCCCT TCAGAGAACA TAATCTGTCT TACAAAAGAG TAGACCTCAT TTTTGGCGAG 3420
 3421 AAGCCTCTTC TGTTTGACCT CATCTAGAAG CTTTGGGGCT CTCCCAGCGC AATCAGATAG 3480
 3481 TCTTGTGAGA GTGTCCTCTT CGTCACCATG CTCATCAGAA GGAGCTGGTT GCGTTCCAAT 3540
 3541 TGAGAAAGCT CGTCCCAAAA GGCTGCATGG TCTATAGGTG GTCCCGAACC CGAGGATTCA 3600
 3601 CCTTGAGACT CATTGTCCAC AGTAGGCTCC TGATCCTCTG CAGCAGCCGC TTGCTGAATG 3660
 3661 GATTCTGCTC TTGACATTAC CATTTGAGA AGCCATAGTC TTCGGATGGT TCTAGCAGAT 3720
 3721 CTTTCAACAT CCAAACCTGGA ACCGAACCAT TGCCGACAAC TTATTCTAAC CTCAAGCTTT 3780
 3781 GAGAGGTTCT CATACTTGGA TTGTGCAGCC TCAAGATCCG TAAGTTCGGT GAAGAAATCT 3840
 3841 AAAGCTTCGC GTTTTGGACC TAACCGAATG ATGATTGGGT GCCGTTTTCG TGGATCCAGA 3900
 3901 AATGGTGTA GTCCTCTAT ACTATCATTC GTGGGACACT CTATCCCTTC CCCAATATGC 3960
 3961 TTCTTTACAA TAGAAGGTAG CTGCGTATAC TTGTTCCGAA CAACAAAGAT GTGACTCTCT 4020
 4021 AGCCGCTTTA CTATTGTGTT CAACACAACG TAGGGTTTTG GCCACTCAA TGTTAATTCT 4080
 4081 GATCGAGCTG CTGATGCTGT GTTCTTGTTG ATCATGTATG AATAGTAGAA CAATGCCAAT 4140
 4141 TGAGGATGCT CACTGTATTC CTTAGGCAGT TTGGTGTGTC CATAAGGTGA CACCAGCTCC 4200
 4201 TTTAGCTGTG GAACATAGAG TACATCAACA GTTCCTACTA GACAACATTC CTTGAGACAA 4260
 4261 TTATGATAGC CATCATGGTC GGTTATCTTA GGTATTTTTT GAGCTTCACT CATCTTCGAA 4320
 4321 GCAACCGTGA TAGATTGAT TGAAGTTCAA ATTCTTATCT AGATGGTGTA TTTGTTTATC 4380
 4381 ATAATTTACA ATACAGTCTG TTTTAATTG CTCGAAGTTG CAGTGAAAGA TGTA AAAAGG 4440
 4441 GGCTTCATTT TGCATACAG ACTTACCCTG ATGTAAAAA TTTTCATCAT AAAAGCAATT 4500
 4501 TCTCGTATAC AAAATGCAGT TTGTTTCGTA TACAGCAAAG CATAGAATAC ACTGTACACT 4560
 4561 GCATTTTATC TACAAGAAAA GTTTTTTTT CTGCTGTGAC TGAATGCTG CAGCAGTACC 4620

Figure 3 (b)

4621 TAGATAGAAA AATGGCATAA AACTGAAATT TTATAGTCAT TTTTCGTGTC TTTCATTCAA 4680
4681 TTTTTTCTCG CAAAAGTTTT CTACAAAAGC AGTCAAAATT GCAATAAGTA TACTACTAATT 4740
4741 ACAAGGCGTC TGAGCGCGTG ACTTGAGCGC GTGACGTAAT CGCGAGCTAC GAAAGTTGTT 4800
4801 TGGGCCTCAG ACATCGGATC GACAGAAGAG GTAAGAATAT TGGGAAAGTA CATTCAATTA 4860
4861 CCACAACAAT CGAGAGATTA GTGGAATTCA GTCATTAATG AAAGGTAGGG TAGTCCGCCT 4920
4921 ACTCTTAGTT CTACATTCAG AATACGCATG CAGTCCTCAA GTTCTGATGA AGACGACCTA 4980
4981 ATTGACCCTA TAATTCATCC CAAATCGTTC TATAGGGCGG CTAACGAGAT ACCGAGAGAC 5040
5041 TTTTTGTTG CGATCCCAT CAGCGCCTAT GTTTTAGCG TATTGCTAA ATCAGTACGA 5100
5101 GATGACTTAC AGGGGCATTT AACGGCGCGA GATATGGCAT TAGCTTATCG TGAACGGCAG 5160
5161 TACTTTCACA GACGCTGGA GACACGAAAC GACCAGCTTG AGATCCCAGA CTGGTCTGAG 5220
5221 ATCCCAGAAT GGTCTCTCGG GTTACTGGAT CGCCCTCCTT GTATCACTGT GGATCTAGCA 5280
5281 AGAGAACTGC GCGAACTATC TCAAAATGG ATCGGAGCAT TCGATCTGGG ATCGAAGATG 5340
5341 TCTGGCAGGC TTCTTCTACA GCTTCTGTAC ACCCAGCTGT CATGCCCAA TGAGGCTGTT 5400
5401 TTCAATAAGC TTTACTGCCT CGTCAAATA CTAAACAAGG ACGTAAATCG TGCGGACCGA 5460
5461 GCCCTTATGG ACTCTGTATT GAGACCACTT TTTGTCGAGA ATCCATACAT GGGTGAATA 5520
5521 GATGAAGAAA TACTTGATAA GATATGGTCC AATTTGACTG AAATGAGAAG TCAAGAGTGG 5580
5581 AAACGTATAG CGGAAGCGTT GTCAGGCGAG AATAATGAC 5619

Figure 3 (c)

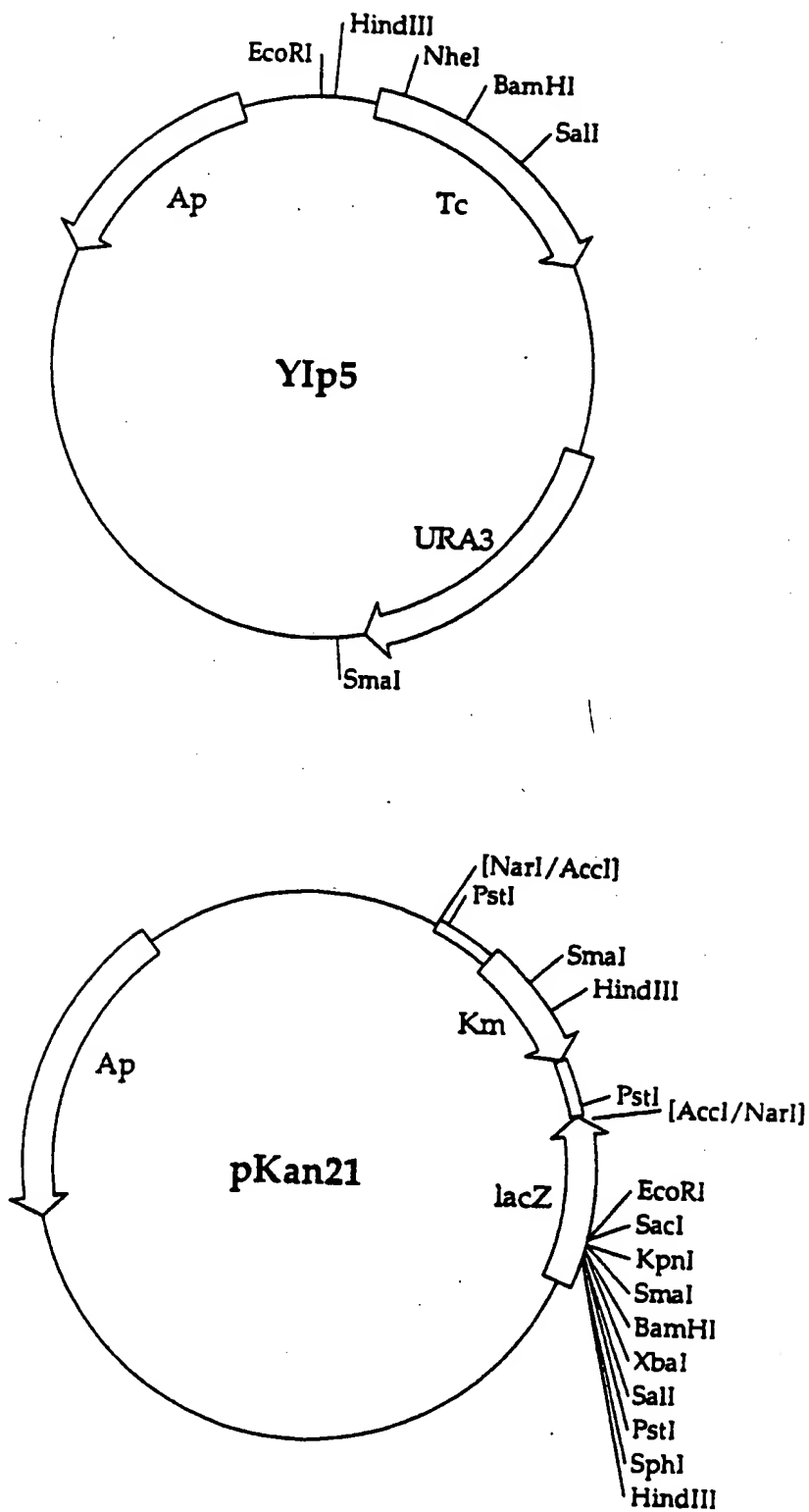


FIGURE 4

7/17

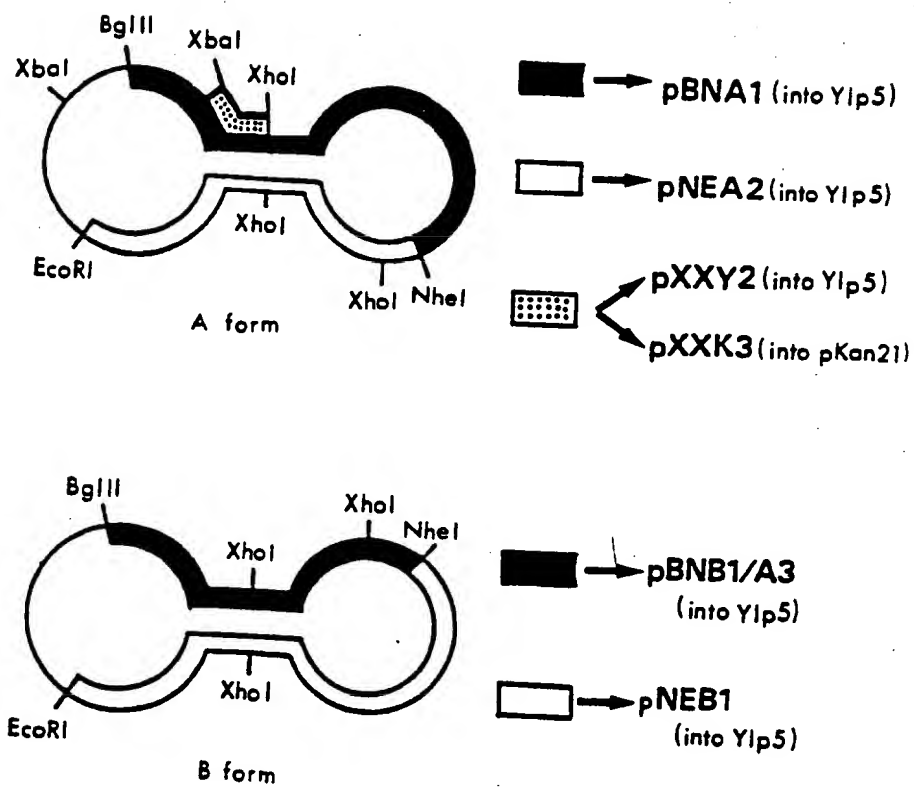


FIGURE 5

8/17

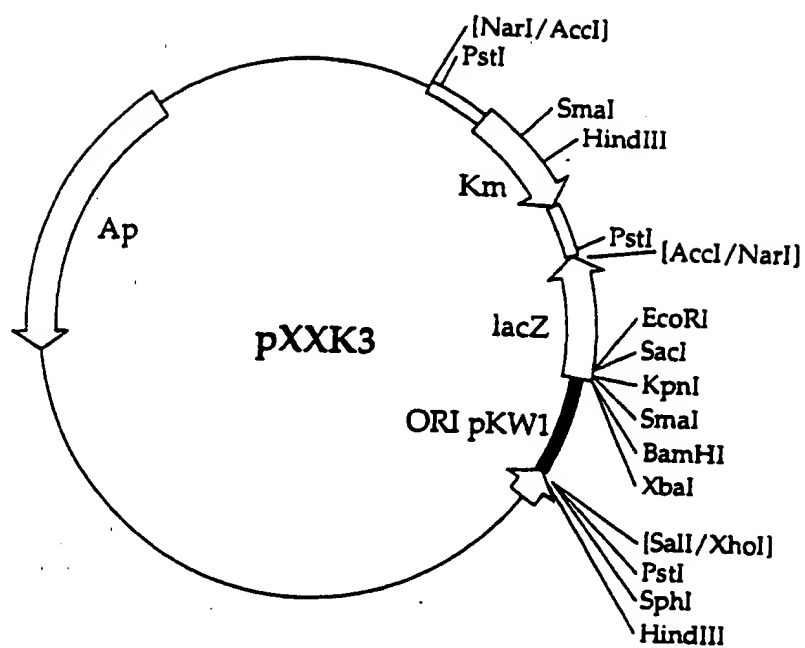


Figure 6

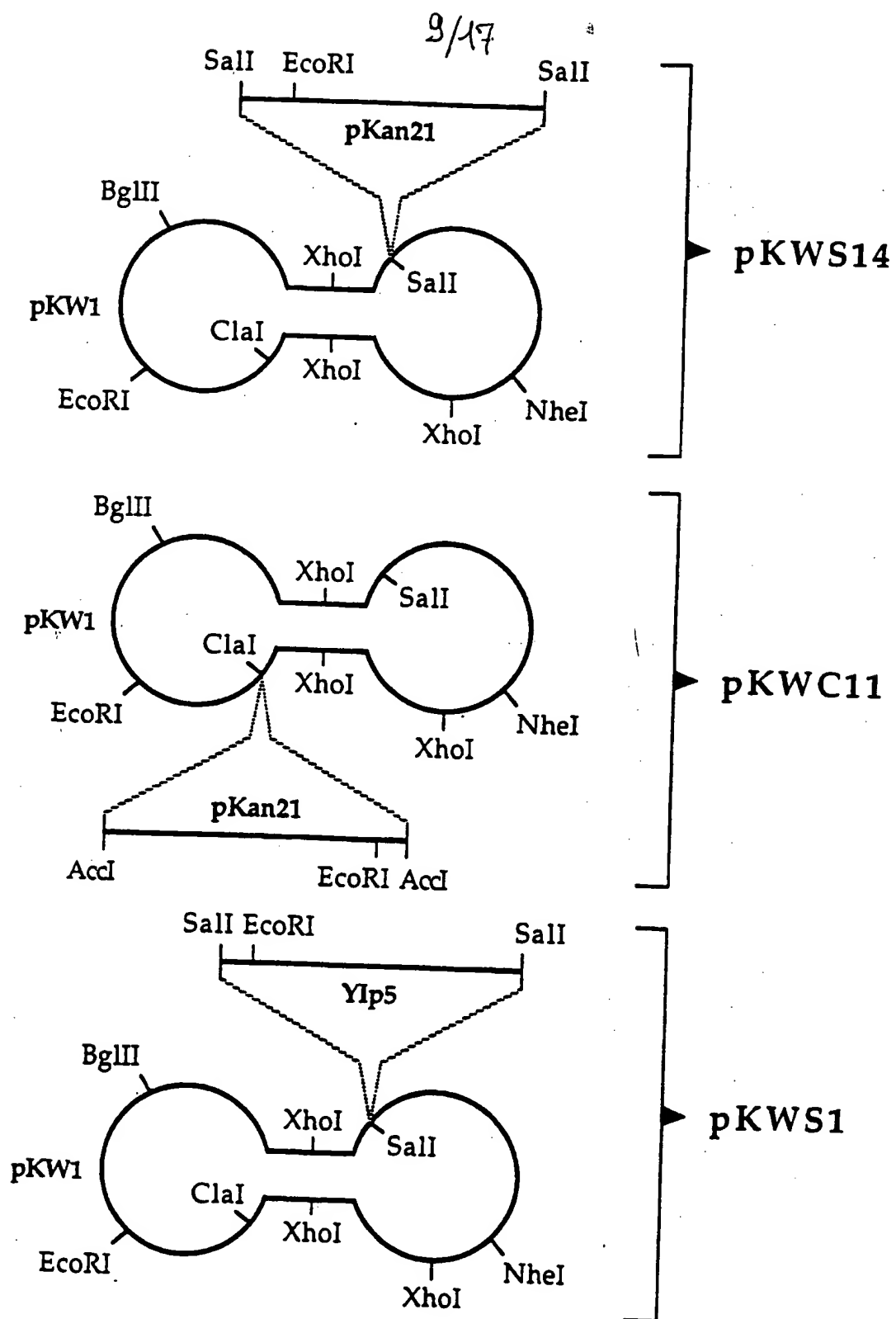


Figure 7

40/42

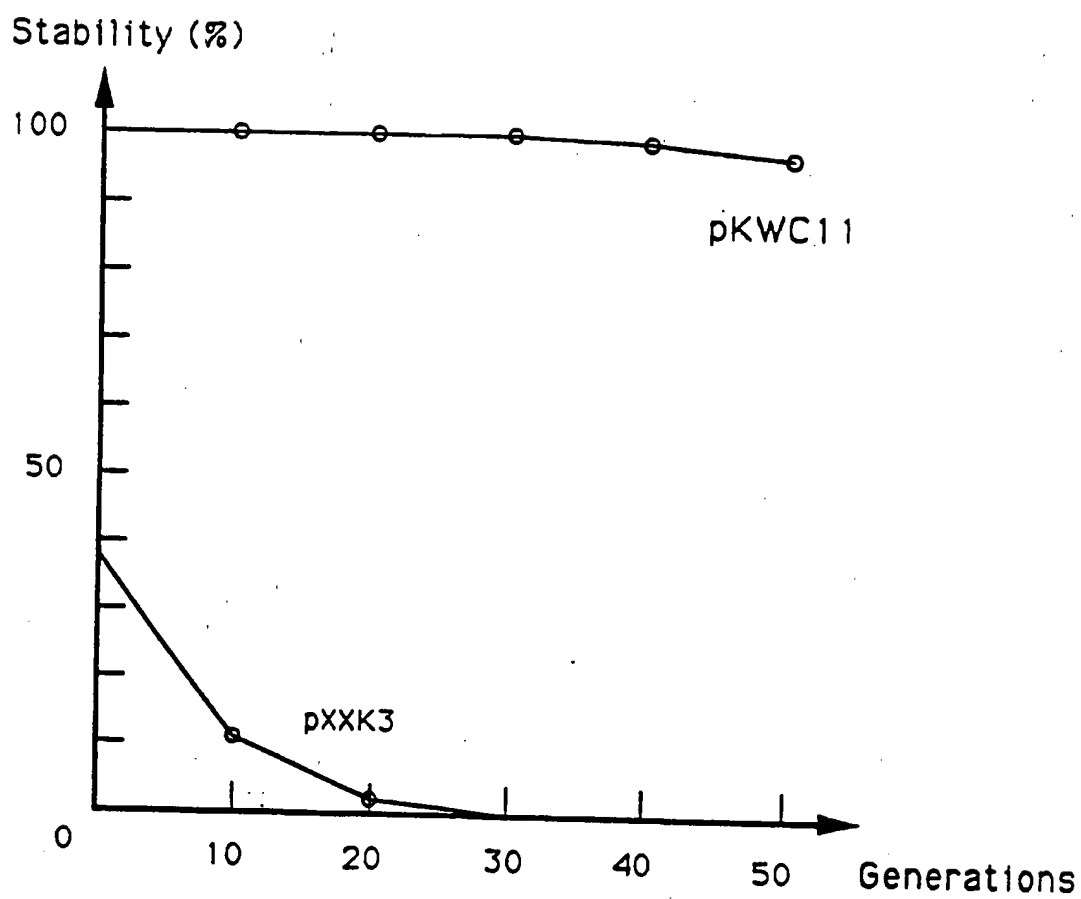


Figure 8

11/17

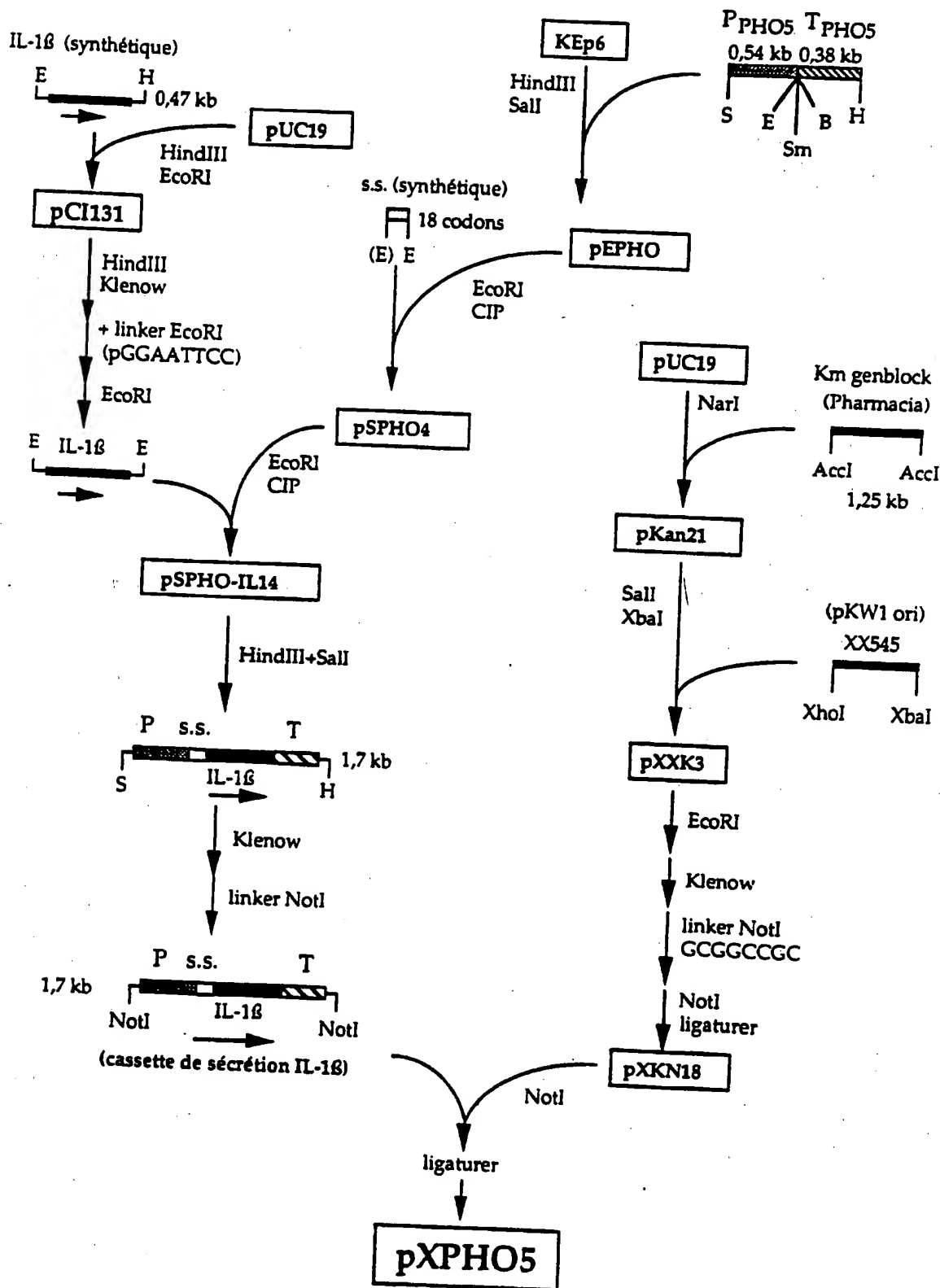


FIGURE 9

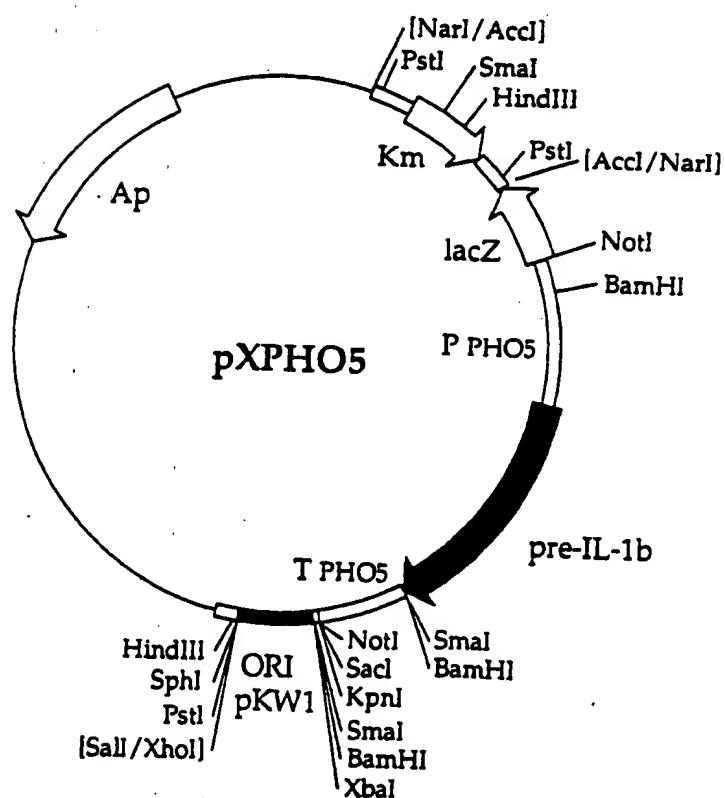
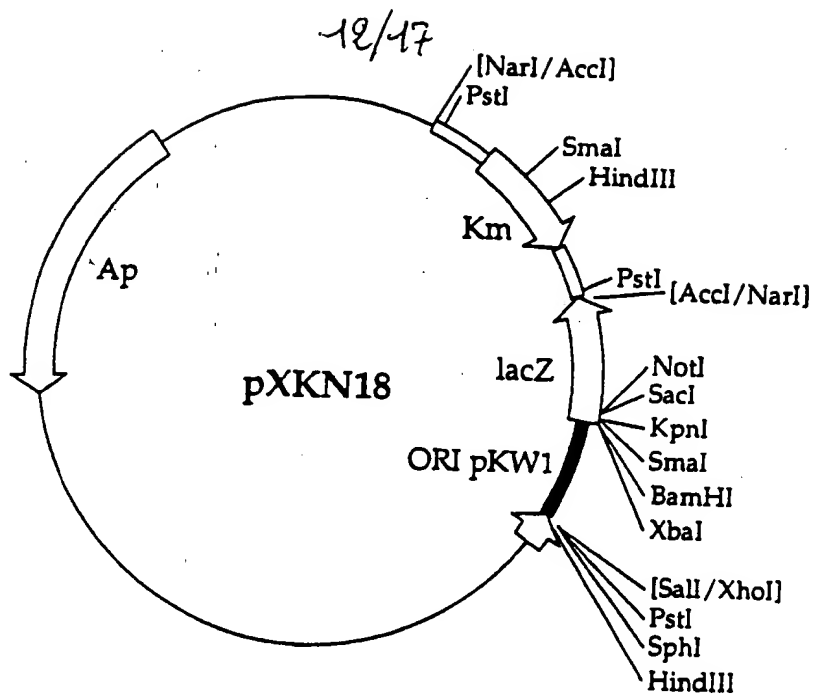
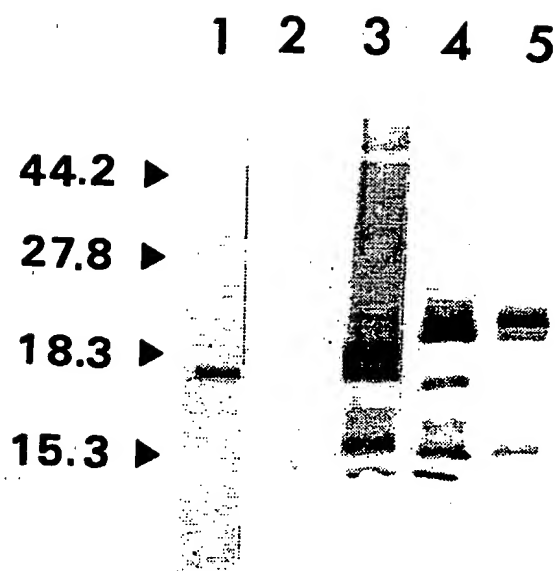


FIGURE 10

13 / 17



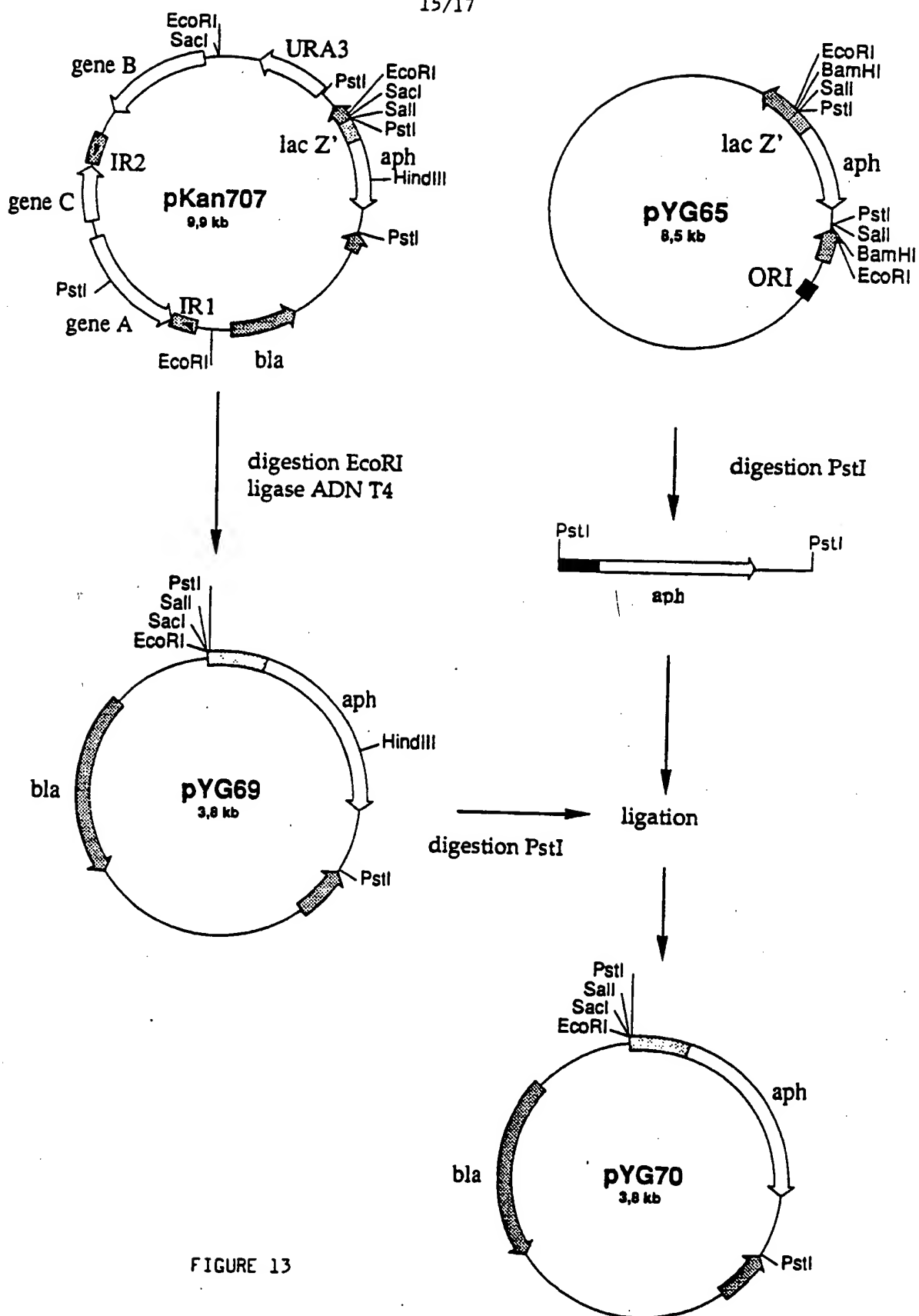


FIGURE 13

16/17

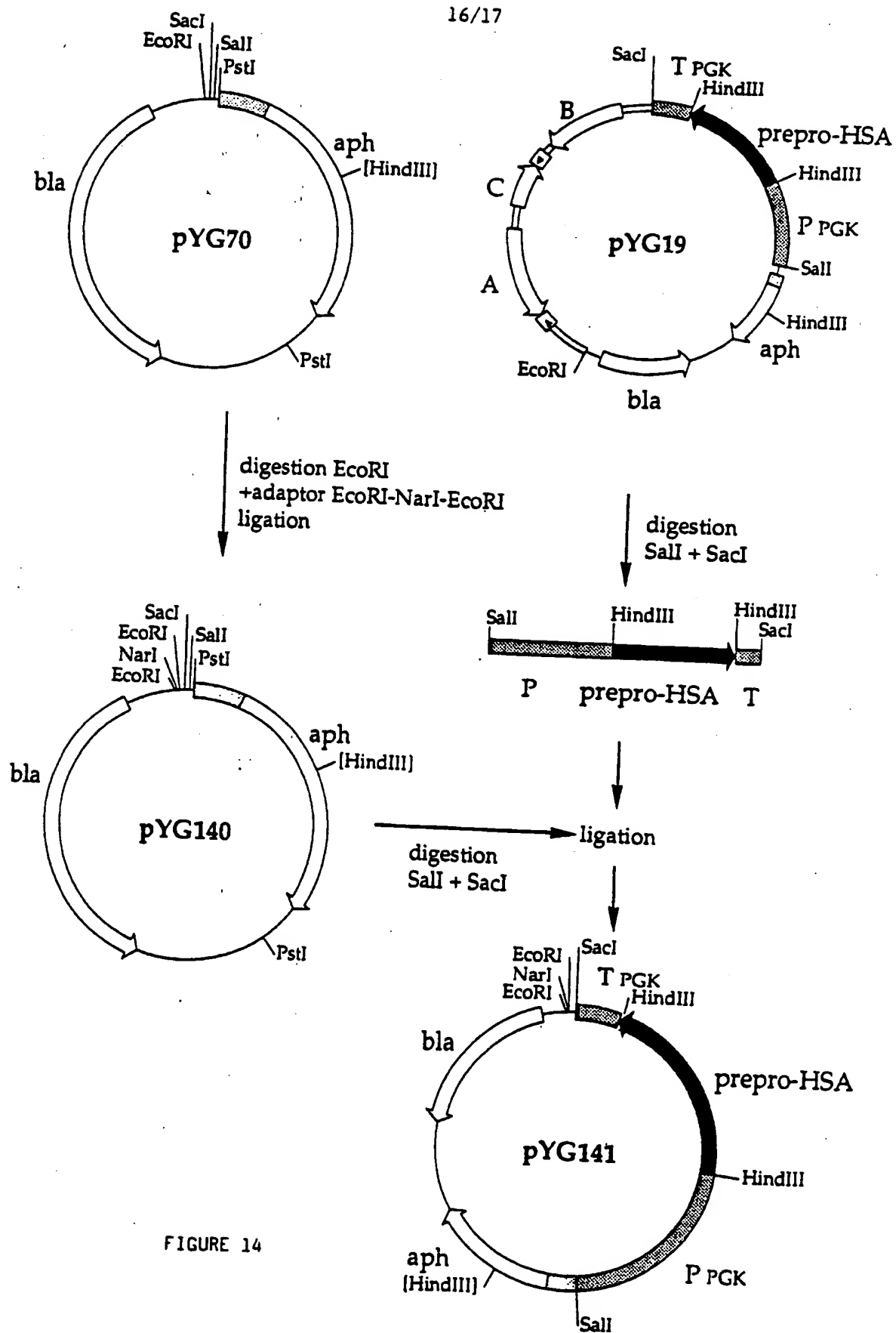


FIGURE 14

17/17

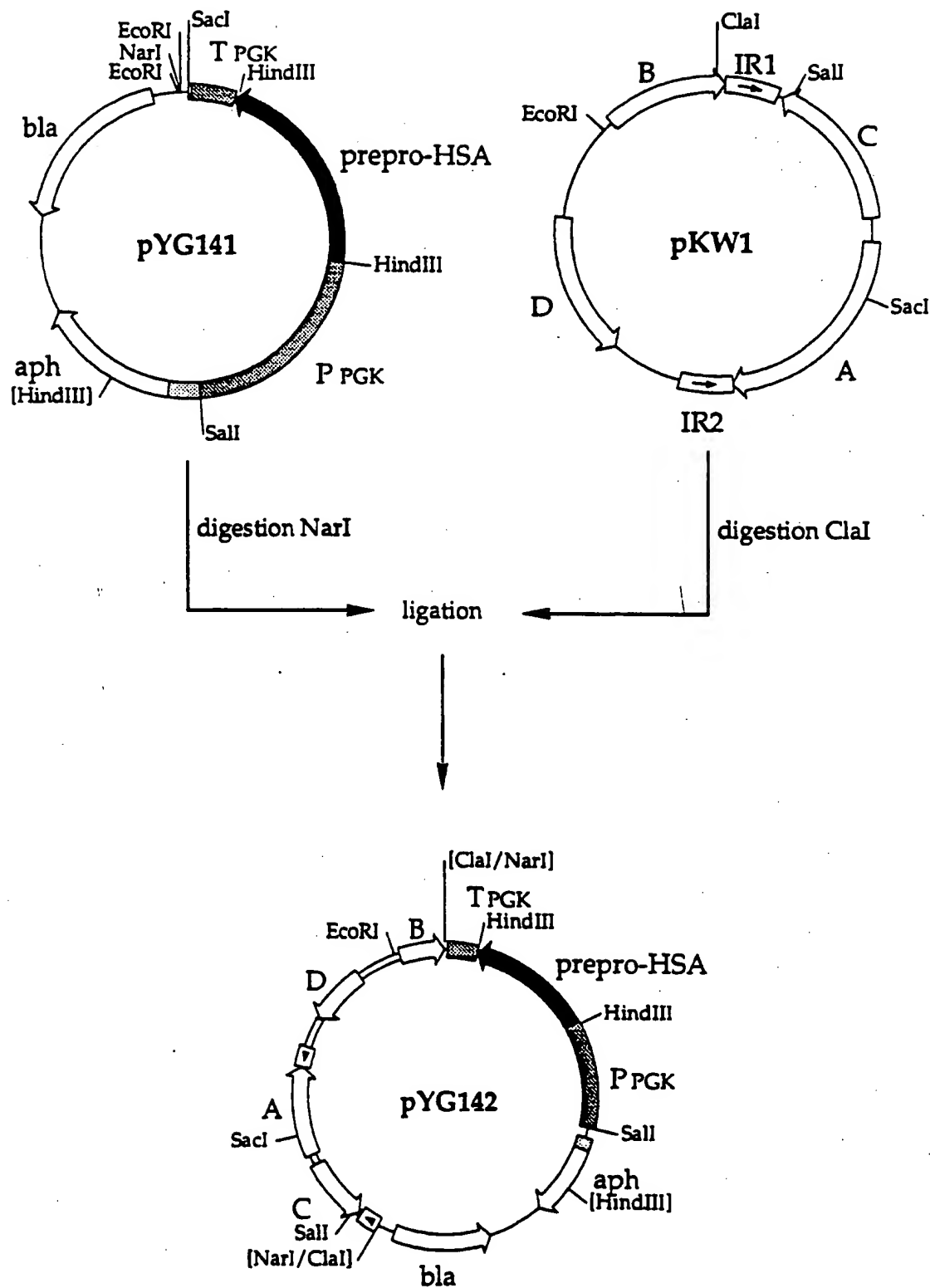


FIGURE 15

MICRO-ORGANISMES

Feuille facultative relative au micro-organisme mentionné en page 20, ligne 10-11 de la description :

A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT :D'autres dépôts sont identifiés sur une feuille supplémentaire : ☐

Nom de l'institution de dépôt :

Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)

Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) :

Oosterstraat 1, P.O. Box 273 - 3740 AG BAARN (Pays-Bas)

Date du dépôt : 4 JUIN 1991

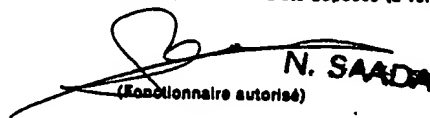
N° d'ordre : CBS 290.91

B. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES : (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements ☐

En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du microorganisme déposé ne sera accessible, jusqu'à la publication de la mention de la délivrance du brevet européen ou jusqu'à la date à laquelle la demande sera rejetée, retirée ou réputée retirée, que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant (règle 28(4) de la CBE).

C. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES : (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)**D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT :** (à ne remplir que si nécessaire)

Les indications énumérées ci-après seront soumises ultérieurement au Bureau International : (spécifier la nature générale des indications p. ex., « No d'ordre du dépôt »)

E. ☐ La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office récepteur)
N. SAADA
(Fonctionnaire autorisé)☐ Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau International : "

(Fonctionnaire autorisé)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00559

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.5: C12N15/81

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.5: C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR,A,2 635 115 (RHONE-POULENC SANTE) 9 February 1990	1-28
X,P	JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY vol. 138, No.2, February 1992, COLCHESTER pages 337 - 345 X.J. CHEN ET AL. 'Characterization circular plasmid from the yeast Kluveromyces waltii'	
A	EP,A,0 301 670 (GIST-BROCADES N.V.) 1 February 1989	
	-/-	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 - "E" earlier document but published on or after the international filing date
 - "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 - "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 - "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 - "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 - "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 - "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 - "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
9 October 1992 (09.10.92)

Date of mailing of the international search report
26 October 1992 (26.10.92)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 92/00559

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CURRENT GENETICS vol. 19, No. 3, 1991, BERLIN, GERMANY pages 163 - 167. C. WILSON AND H. FUKUHARA 'Distribution of mitochondrial rl-type introns and the associated open reading frame in the yeast genus Kluyveromyces'</p> <hr/>	

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. FR 9200559
SA 61252**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 09/10/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2635115	09-02-90	AU-B- 623425	14-05-92
		AU-A- 3933289	08-02-90
		EP-A- 0361991	04-04-90
		FR-A- 2649991	25-01-91
		JP-A- 2276589	13-11-90

EP-A-0301670	01-02-89	US-A- 4943529	24-07-90
		AU-A- 2014888	02-03-89
		JP-A- 2000476	05-01-90

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 92/00559

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷ Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB <div style="font-size: 1.2em; margin-top: 5px;">CIB 5 C12N15/81</div>		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ⁹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
A X,P A	<div style="margin-bottom: 10px;">FR,A,2 635 115 (RHONE-POULENC SANTE) 9 Février 1990</div> <div style="text-align: center;">---</div> <div style="margin-bottom: 10px;">JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY vol. 138, no. 2, Février 1992, COLCHESTER pages 337 - 345 X.J. CHEN ET AL. 'Characterization of a circular plasmid from the yeast Kluyveromyces waltii'</div> <div style="text-align: center;">---</div> <div style="margin-bottom: 10px;">EP,A,0 301 670 (GIST-BROCADES N.V.) 1 Février 1989</div> <div style="text-align: center;">---</div> <div style="text-align: right;">-/--</div>	1-28
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹¹ Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"A" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="font-size: 1.2em; margin-top: 5px;">09 OCTOBRE 1992</div>	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="font-size: 1.2em; margin-top: 5px;">26. 10. 92</div>	
Administration chargée de la recherche internationale <div style="font-weight: bold; margin-top: 5px;">OFFICE EUROPEEN DES BREVETS</div>	Signature du fonctionnaire autorisé <div style="font-weight: bold; margin-top: 5px;">VAN PUTTEN A.J.</div>	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICES SUR LA
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie *	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	<p>CURRENT GENETICS vol. 19, no. 3, 1991, BERLIN, GERMANY pages 163 - 167 C. WILSON AND H. FUKUHARA 'Distribution of mitochondrial r1-type introns and the associated open reading frame in the yeast genus Kluyveromyces'</p> <p>-----</p>	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9200559
SA 61252

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 09/10/92

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2635115	09-02-90	AU-B- 623425	14-05-92
		AU-A- 3933289	08-02-90
		EP-A- 0361991	04-04-90
		FR-A- 2649991	25-01-91
		JP-A- 2276589	13-11-90

EP-A-0301670	01-02-89	US-A- 4943529	24-07-90
		AU-A- 2014888	02-03-89
		JP-A- 2000476	05-01-90

ETO FORM P007

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

International Publication No. WO 93/00437

Job No.: 1074-85208

Ref.: 06832.0004-02000

**Translated from French by the Ralph McElroy Translation Co.
910 West Avenue, Austin, Texas, 78701**

INTERNATIONAL PATENT OFFICE
WORLD ORGANIZATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY

International patent published on
the basis of the Patent Cooperation Treaty (PCT)
INTERNATIONAL PUBLICATION NO. WO 93/00437 A1

International Patent Classification ⁵ :	C 12 N	15/81
International Filing No.:	PCT/FR92/00559	
International Filing Date:	June 19, 1992	
International Publication Date:	January 7, 1993	
Priority		
Date:	June 21, 1991	
Country:	FR	
No.:	91/07640	

CLONING AND/OR EXPRESSION VECTORS, PREPARATION AND USE

Inventors; and
Inventors/Applicants (only for US):

Xin-Jie Chen [CN/FR]
15, rue Georges-Clémenceau
Centre Universitaire Orsay
F-91405 Orsay (FR)

Reinhard Fleer [DE/FR]
47, avenue Beauséjour
F-91440 Bures-sur-Yvette (FR)

Hiroshi Fukuhara [JP/FR]
160, avenue du Général-Leclerc
Résidence de Courcelles – Bât. 7
F-91190 Gif-sur-Yvette (FR)

Applicant (for all designated
states except US):

Rhone-Poulenc Rorer S.A. [FR/FR]
20, avenue Raymond-Aron
F-92160 Antony (FR)

Agent:

Philippe Becker
Rhône-Poulenc Rorer S.A.
Direction Brevets
20, avenue Raymond-Aron
F-92165 Antony Cédex (FR)

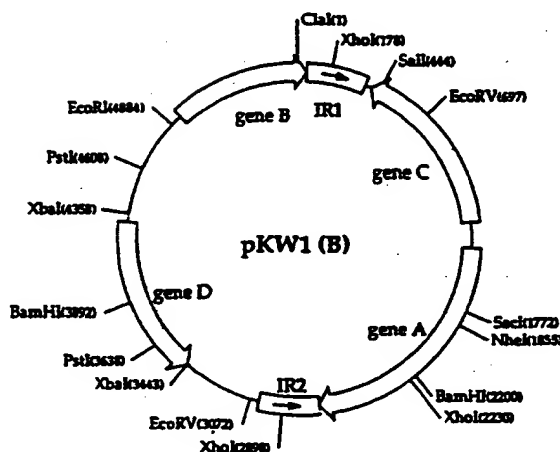
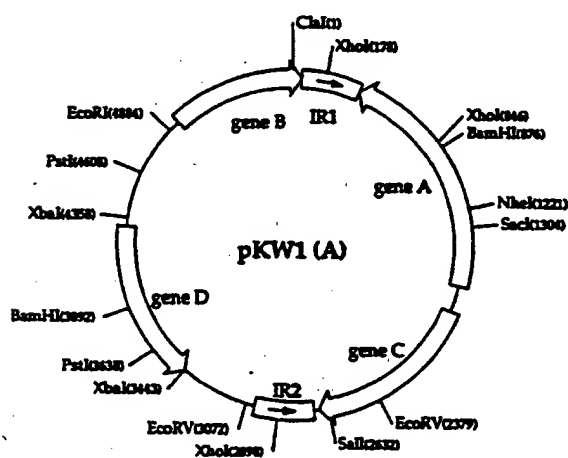
Designated States:

AU, CA, FI, HU, JP, NO, US,
European Patent (AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC,
NL, SE)

Published

With International Search Report.

Before expiration of the period permitted for amendments to the claims. Will be republished if amendments are submitted.



(57) Abstract

The invention discloses a new yeast plasmid, new cloning and/or expression vectors derived from said plasmid, and use thereof.

FOR INFORMATION ONLY

Codes for the identification of PCT contract states on the cover sheets of the documents that publish the international applications in accordance with the PCT.

AT	Austria	ES	Spain	MG	Madagascar
AU	Australia	FI	Finland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	France	MN	Mongolia
BE	Belgium	GA	Gabon	MR	Mauritania
BF	Burkina Faso	GB	United Kingdom	MW	Malawi
BG	Bulgaria	GN	Guinea	NL	Netherlands
BJ	Benin	GR	Greece	NO	Norway
BR	Brazil	HU	Hungary	PL	Poland
CA	Canada	IE	Ireland	RO	Romania
CF	Central African Republic	IT	Italy	RU	Russian Federation
CG	Congo	JP	Japan	SD	Sudan
CH	Switzerland	KP	Democratic People's Republic of Korea	SE	Sweden
CI	Côte d'Ivoire	KR	Republic of Korea	SN	Senegal
CM	Cameroon	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CS	Czechoslovakia	LK	Sri Lanka	TD	Chad
DE	Germany	LU	Luxembourg	TG	Togo
DK	Denmark	MC	Monaco	US	United States of America

The present invention concerns a new yeast plasmid, as well as new cloning and/or expression vectors derived therefrom, their preparation and their use, notably for the production of recombinant proteins. The invention also concerns recombinant host cells containing such vectors.

More specifically, the present invention concerns all or part of a new plasmid isolated from the yeast *Kluyveromyces waltii* or a derivative thereof, and the cloning and/or expression vectors constructed from it.

During the past ten years, yeasts have become very promising host microorganisms for the production of heterologous proteins.

In particular, the identification by Beggs et al. (Nature 275 (1978) 104) of the plasmid 2 μ and vectors derived therefrom was one of the keys of the current development of the genetic and molecular study of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Since that time, the 2 μ system has allowed the introduction and the expression of heterologous genes in yeast to obtain proteins of pharmaceutical or agro food interest. However, plasmid 2 μ and its derivatives can replicate effectively only in yeasts belonging to the species *S. cerevisiae* and to some related species. Therefore, this system cannot be used for genetic manipulation in most yeast species. Notably, it cannot be used in yeasts whose physiological properties, which are different from those of *S. cerevisiae*, would allow better-performing new applications and/or industrial uses.

Different laboratories therefore have sought other plasmids in different yeast species. Thus, several circular plasmids have been found in the yeasts of the genus *Zygosaccharomyces*, and notably the plasmids pSR1 and pSR2 (Toh-é et al., J. Bacteriol. 151 (1982) 1380); pSB1, pSB2, pSB3 and pSB4 (Toh-é et al., J. Gen. Microbiol. 130 (1984) 2527); and pSM1 (Utatsu et al., J. Bacteriol. 169 (1987) 5537). A circular plasmid has also been found in *Kluyveromyces drosophilum*: pKD1 (Falcone et al., Plasmid 15 (1986) 248).

All these plasmids present characteristics which they share with plasmid 2 μ , notably inverted repeat sequences, and the existence of two possible isomeric forms due to a site-specific recombination site.

However, these plasmids always present the drawback of having a narrow host spectrum. Thus, because of their specificity with respect to yeast hosts, these plasmids can only be used in a limited number of strains.

The present invention is the result of the identification of a natural plasmid of the yeast *Kluyveromyces waltii*. This plasmid, called pKW1, is the first known natural plasmid of this yeast species. The plasmid has been purified from the strain *K. waltii* CBS 6430, and it has been mapped using restriction enzymes; the resulting map is presented in Figure 1.

An object of the invention thus consists of the plasmid pKW1 isolated from the strain *K. waltii* CBS 6430, or any fragment or derivative thereof.

In the meaning of the invention, the term derivative denotes plasmids which, in spite of some modifications, preserve the properties of the original plasmid. Notably, the modifications can take on the form of mutations or deletions concerning regions having a relatively large size. They can also be insertions or suppressions, for example, of cloning sites.

The term pKW1 fragment notably denotes the different genetic elements of this plasmid. It is more advantageous to notably mention, as genetic elements of pKW1, the structural genes or parts thereof, functional promoter sequences, inverted repeat sequences, or sequences (IR) that allow replication (replication origin) or confer stability to the plasmid (stability locus).

Indeed, the structural study of plasmid pKW1 has allowed the detection of analogies with the plasmid 2 μ of *S. cerevisiae*. Thus, 4 structural genes have been identified (see Figure 2), as well as a replication origin. Moreover, the cloning of pKW1 in *E. coli* has allowed the isolation of 4 types of recombinant plasmids, corresponding to 2 isomeric forms of plasmid pKW1 (forms A and B) cloned in the vector pKan21 in the two possible orientations (vector pKan21 is described in Example 3.1). These two forms are presented in Figure 1. The existence of two isomeric forms indicates the presence of inverted repeat sequences. The study has thus shown that plasmid pKW1 contains a pair of inverted repeat sequences each having a length of 0.3 kb, and two unique sequences of 2.5 and 2.3 kb, whose orientation distinguishes the two isomeric forms A and B. The molecular size of plasmid pKW1 is thus approximately 5.5 kb. Different restriction sites have been detected, for example, the following sites: EcoRI, SphI, SalI, ClaI, NheI and BglI.

The complete nucleotide sequence of plasmid pKW1 has also been determined (Figure 3). The absence of homology between this sequence and that of known plasmids has been demonstrated, notably by hybridization experiments (see Example 2). The absence of hybridization under conditions of moderate stringency is characteristic of this difference in sequence.

In a preferred embodiment, the invention relates to a plasmid comprising all or part of the sequence presented in Figure 3 or a derivative thereof.

Moreover, the applicant has also shown that it is possible to use plasmid pKW1 or fragments thereof to construct particularly stable cloning and/or expression vectors.

Another object of the present invention thus consists of cloning and/or expression vectors characterized in that they comprise all or part of plasmid pKW1 of *K. waltii* CBS 6430 represented in Figure 1, or a derivative thereof.

A more specific object of the invention consists of a cloning and/or expression vector characterized in that it comprises at least one genetic element of plasmid pKW1.

Because of the host spectrum of plasmid pKW1, the vectors of the invention can be used in species other than the natural host *K. waltii*.

Advantageously, according to the present invention, plasmid pKW1 is linearized at the level of a unique restriction site:

A particularly interesting site in this regard is the unique *Cl*I site located in position 1 in Figure 1. Indeed, the applicant has shown that this site allowed the use of plasmid pKW1 to construct the cloning and/or expression vectors, by introducing at this level, for example, heterologous DNA fragments, while maintaining the stable replication of the vector obtained. This result is surprising to the extent that site *Cl*I is located in structural gene B.

The use of such neutral cloning sites thus allows the obtention of very stable vectors which are capable of staying in the transformed cells, even in the absence of any selective pressure.

Advantageously, the vectors of the invention contain, in addition, a heterologous DNA sequence comprising at least one structural gene, under the control of signals allowing its expression.

The signals allowing the expression of the structural gene(s) can consist of one or more elements chosen from promoters, terminators or secretion signals. It is understood that the signals are chosen as a function of the used host, the structural gene and the desired result. In particular, it can be preferable in some cases to use a promoter which can be regulated, allowing the decoupling between the growth phases of the hosts and the phase of expression of said structural gene(s). Similarly, the use of the peptide signal (secretion signal) can make it possible to increase the production rate of the desired protein and facilitate the purification step.

It is preferred for the promoters used to be derivatives of yeast genes. Promoters of particular interests are those derived from glycolytic genes of yeasts of the genus *Saccharomyces* or *Kluyveromyces*. Notably, one can cite the promoters of genes coding for phosphoglycerate kinase of *S. cerevisiae* (PGK), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPD), enolases (ENO), alcohol dehydrogenases (ADH). One can also cite promoters derived from strongly expressed genes, such as the lactase gene (LAC4) or the acid phosphatase gene (PHO5).

Moreover, these genes can be modified by mutagenesis, for example, to add additional transcription control elements, such as, notably, UAS ("Upstream Activating Sequence") regions.

The structural gene which can be introduced into the vectors of the invention preferably codes for a polypeptide of pharmaceutical or agro food interest. For example, one can mention enzymes, such as, notably, superoxide dismutase, catalase, amylases, lipases, amidases, chymosine, etc.), blood derivatives (such as serum albumin, alpha- or beta-globin, factor VIII, factor IX, van Willebrand factor, fibronectin, alpha-1 antitrypsin, etc.), insulin and its variants, lymphokines (such as interleukines, interferons, colony stimulation factors (G-CSF, GM-CSF, M-CSF...), TNF, TRF, etc.), growth factors (such as growth hormone, erythropoietin, FGF,

EGF, PDGF, TGF, etc.), apolipoproteins, or antigenic polypeptides for the manufacture of vaccines (hepatitis, cytomegalovirus, Epstein-Barr, herpes, etc.).

In a special embodiment of the invention, the structural gene can be a gene resulting from the fusion of several DNA sequences. The gene can notably be a gene coding for a hybrid polypeptide containing an active part associated with the stabilizing part. As an example, one can mention the fusion between albumin or albumin fragments and a receptor part of a virus receptor (CD4, etc.).

In another embodiment, the heterologous DNA sequence can comprise several structural genes, notably genes involved, at the genetic or biochemical level, in the biosynthesis of a metabolite. The metabolite can be, in particular, an antibiotic, an amino acid or a vitamin.

In a special embodiment, the vectors of the invention contain, in addition:

- an *E. coli* replicon and/or
- at least one selection marker.

These elements allow the manipulation of the vectors of the invention in a much easier manner.

Another object of the invention concerns recombinant cells containing a vector as defined above.

The recombinant cells are preferably chosen from yeasts.

The applicant has shown that the vectors of the invention can indeed be used either in *K. waltii* (the natural host of pKW1) or in yeasts of different species or even different genera. Notably, they can be used in other *Kluyveromyces* species or in *Saccharomyces*. Moreover, when strain *K. waltii* CBS 6430 is used as the host cell, homologous recombinations between the vectors of the invention and the resident plasmid pKW1 can affect the stability of the vectors, and thus decrease the performances of the host/vector pair. To further improve the stability of the vectors of the invention in such a host/vector pair, the applicant has prepared a strain *K. waltii* pKW1⁻ (KW18). This strain allows the optimization of the industrial use of the vectors of the invention (see Example 4).

Different techniques can be used to introduce the vectors of the invention into the host cells. In particular, transformation (Bianchi et al., Curr. Genet. 12 (1978) 185) and electroporation (Delorme, Appl. Environ. Microbiol. 155 (1989) 2242) yield good results. However, it is clear that the invention is not limited to a particular technique.

An object of the invention also consists of a method for the preparation of a polypeptide according to which a recombinant cell as defined above can be cultured and the produced polypeptide recovered. More specifically, the method of the invention allows the production of proteins of pharmaceutical or agro food interest, such as those indicated above. More

specifically, the method of the invention can be adapted to the production of human albumin and of its variants or precursors.

In the case where the structural genes are involved in the biosynthesis of a metabolite, the recombinant cells can also be used directly in a bioconversion process.

Other advantages of the invention will become apparent after a reading of the following examples which must be considered to be illustrative and nonlimiting.

Legend of the figures

Figure 1: Restriction map of plasmid pKW1. The inverted repeat sequences as well as the structural genes A-D are indicated. The positions indicated for the restriction sites correspond to the first nucleotide recognized by the enzyme.

Figure 2: Study of the open frames of plasmid pKW1. The genetic elements indicated are localized at the following positions with reference to the sequence presented in Figure 3: Gene A: nucleotides 1454-2755; gene B: nucleotides 4948-54; gene C: nucleotides 389-1309 on the complementary strand; gene D: nucleotides 3444-4313 on the complementary strand; IR1: nucleotides 53-368; IR2: nucleotides 2713-3028.

Figure 3: Nucleotide sequence of plasmid pKW1. The sequence represented corresponds to the B form of the plasmid. Position 1 corresponds to the first nucleotide of the sequence recognized by the enzyme *Cla*I. Plasmid pKW1 was fragmented by restriction enzymes, and the fragments were cloned in pTZ18R (Pharmacia). The sequences of the cloned segments were determined using the 2-strand Sanger method.

Figure 4: Restriction maps of the shuttle plasmids YIP5 and pKan21. Ap: ampicillin resistance gene; Tc: tetracycline resistance gene; Km: kanamycin resistance gene (G418); LacZ: structural gene of β -galactosidase.

Figure 5: Strategy of construction of the vectors pBNA1, pNEA2, pBNB1/A3, pNEB1, pXXY2 and pXXK3. See also Table 1.

Figure 6: Restriction map of the vector pXXK3.

Figure 7: Strategy of construction of the vectors pKWC11, pKWS1 and pKWS14.

Figure 8: Study of the stability of vectors pKWC11 and pXXK3 in the strain *K. waltii* KW18. In each case, a transformed clone was cultured in nonselective YPG medium for the indicated number of generations, and then aliquots of the culture were plated on YPG agar Petri dishes with and without G418, to determine the total number of cells and the number of cells resistant to G418. The stability corresponds to the % of resistant cells.

Figure 9: Strategy of construction of the expression vector pXPHO5. Abbreviations: P = promoter, T = terminator, ss = secretion signal, CIP = Calf Intestinal Phosphatase, Km = kanamycin, E = *Eco*RI, H = *Hind*III, S = *Sal*I, B = *Bam*HI, Sm = *Sma*I.

Figure 10: Restriction maps of the vectors pXKN18 and pXPHO5. Legend: see Figure 9.

Figure 11: Immunological detection of IL1 β produced by *K. waltii*. The molecular weight markers (KDa) are indicated on the left. Well 1: Reference IL-1 β (100 ng); well 2: culture supernatant of the transformant pXKN18 (without IL-1 β cassette); well 3: culture supernatant of the transformant pXPHO5 treated with endo-N-acetylglucosamidase H; wells 4 and 5: supernatants of the cultures of the transformants pXPHO5 in LPi and HPi medium, respectively.

Figure 12: Strategy of construction of the plasmid pYG65.

Figure 13: Strategy of construction of the plasmid pYG70.

Figure 14: Strategy of construction of the plasmid pYG141. aph: gene coding for aminoglycoside 3'-phosphotransferase, which confers resistance to kanamycin; bla: gene coding for the β -lactamase which confers resistance to ampicillin.

Figure 15: Strategy of construction of the plasmid pYG142.

Tables 1 and 2: Composition of vectors derived from pKW1 according to the invention.

(*) Cloning sites.

Tables 3, 4 and 5: Transformation by the vectors of the invention of *S. cerevisiae*, *K. waltii* and different strains of *Kluyveromyces*, respectively. The stability of the transformants is expressed by the percentages of Ura⁺ cells after 10 generations of growth in nonselective YPD medium. The isonuclear strains *K. waltii* pKW1⁺ and pKW1⁻ are CBS 6430 and KW18, respectively.

General cloning technique

The classical methods of molecular biology, such as centrifugation of plasmid DNA in a cesium chloride-ethidium bromide gradient, digestion by restriction enzymes, gel electrophoresis, electroelution of DNA fragments from agar gels, transformation in *E. coli*, etc., are described in the literature (Maniatis et al., "Molecular Cloning: a Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986; Ausubel et al. (eds.), "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons, New York 1987).

In vitro mutagenesis directed by oligodeoxynucleotides is carried out according to the method developed by Taylor et al. (Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764) using the kit distributed by Amersham. Sequencing of nucleotides is carried out according to the dideoxy technique described by Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467). Enzymatic amplification of specific DNA fragments is carried out by the PCR ("Polymerase-catalyzed Chain Reaction") reaction under the conditions described by Mullis and Faloona (Meth. Enzym., 155 (1987) 335-350) and Saiki et al. (Science 230 (1985) 1350-1354), using a "DNA thermal cycler" (Perkin-Elmer Cetus) following the recommendations of the manufacturer.

Examples

1) Isolation and purification of pKW1

Strain CBS 6430 is cultured in 2 L of YPG medium (yeast extract 1%, Bactopeptone 1%, glucose 2%) with stirring at 26°C for approximately 18 h. The cells in the early stationary phase are harvested by centrifugation. 13-15 g of cell mass per liter are usually obtained. The cells are washed with 150 mL of 1M sorbitol containing 30 mg of zymolyase 20T (Kirin Breweries Co., Tokyo). After incubation at 30°C for 1 h, one adds to the suspension of protoplasts 5 mL of 10% sodium dodecyl sulfate and 5 mL of 0.5M EDTA, pH 7.0. The mixture is immediately vigorously stirred and incubated at 50°C for 1-2 h. Potassium acetate is added to the lysate to obtain a final concentration of 1M and the mixture is maintained in ice for 2 h. The precipitates formed are eliminated by centrifugation (Sorvall SS34, 15,000 rpm, 30 min). The supernatant, to which 2 volumes of 95% ethanol are added, is cooled in ice to precipitate the nucleic acids. The precipitates are collected by centrifugation, washed with ethanol at 70%, dried under a vacuum, and finely dissolved in 40 mL of 5 x TE (1x TE is 10mM tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8). After the addition of 40 g of CsCl in 5 mL of ethidium bromide (stock solution of 10 mg/mL), the mixture is centrifuged at 60,000 rpm for 6 h (Beckman, rotor 60 Ti). The fluorescent band of the plasmid DNA is located below the major band of the chromosomal DNA. The DNA of the plasmid is collected and subjected to the second centrifugation cycle in CsCl/ethidium bromide. The collected plasmid DNA is mixed with one volume of isopropanol which has first been equilibrated with 4M CsCl to eliminate the ethidium bromide. After several extractions with isopropanol, the DNA solution is dialyzed against 1 x TE. The volume of the solution can be reduced by dialysis against polyethylene glycol 6000 in flakes.

2) Sequencing and studies of homologies

Plasmid pKW1 was sequenced using the method described by Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467). The complete sequence is indicated in Figure 3.

The absence of a homology between this sequence and that of known plasmids was determined by molecular hybridization experiments: pKW1 is labeled with ³²P and hybridized with the following plasmids, which were first immobilized on a nitrocellulose filter:

- plasmid 2μ from *S. cerevisiae*,
- pSR1, pSB3 and pSB4 from *Z. rouxii*,
- pSB1 and pSB2 from *Z. bailii*, and
- pKD1 from *K. drosophilae*.

The hybridization was carried out under moderately stringent conditions (0.6M Na⁺, 65°C, 18 h); none of the plasmids produced a positive signal of hybridization.

The other circular plasmids (pSB1, pSB4) whose sequences have not yet been described are also different from pKW1, in the molecular size, the length of the inverted repeats, and in their host species.

3) Constructions of cloning vectors derived from pKW1

Two types of recombinant molecules were constructed from pKW1.

3.1 In the first type, different fragments of pKW1 (corresponding, for example, to the genetic elements of pKW1) were introduced into shuttle vectors, and notably into the vectors YIp5 (Struhl et al., Proc. Nat. Acad. Sci USA 76 (1979) 1035) and pKan21, represented in Figure 4.

Plasmid pKan21 was constructed by insertion of the gene *aph* (Genblock, Pharmacia) which confers resistance to kanamycin (G418) in the form of a 1.25 kbp *AccI* fragment, in the *NarI* site of plasmid pUC19 (Viera and Messing, Gene 19 (1982) 259). Thus, pKan21 contains, in addition to *aph*, the gene *bla* which confers resistance to ampicillin and the replication origin of ColE1 which allows replication in *E. coli*. The yeasts transformed by the vectors derived from pKan21 can be detected by their growth on a medium containing 200 µg/mL of geneticine (G418).

Plasmid YIp5 is a derivative of plasmid pBR322 in which the gene *URA3* from *S. cerevisiae* was inserted as a selection marker. The yeast, transformed by the derivatives of YIp5, is detected by its growth on a uracil-free medium. In the last case, the host yeast is an auxotroph which is deficient in orotidine-monophosphate carboxylase of the uracil synthesis pathway.

The vectors of this first type are pBNA1, pNEA2, pBNB1/A3, pNEB1, pXXY2 and pXXK3 (Table 1 and Figure 4).

- Vector pBNA1

pKW1 is digested with *BglII* and *NheI* (see Figure 5) and the DNA fragments are separated by electrophoresis. The 2.4-kbp fragment is recovered and inserted by ligation between the unique *BamHI* and *NheI* sites in the tetracycline resistance gene of plasmid YIp5 (Yanish-Peron et al., Gene 33, 1985, 103-119), where the latter was first digested by *BamHI* and *NheI* and repurified. The *BglII* and *BamHI* ends are compatible for a specific ligation. *E. coli*, transformed by the ligation mixture, is selected on LB agar medium which contains ampicillin. The insertion is verified by replication of the transformants on LB agar medium containing tetracycline, as the latter are sensitive to this antibiotic. The structure of the plasmid is verified by extraction of the DNA from individual transformants and its analysis using restriction enzymes. For example, plasmid pBNA1, digested by *PstI*, produces 3 fragments of 3.28, 3.15 and 1.36 kbp: double digestion with *PstI/NheI* yields 4 fragments of 3.15, 2.3, 1.36 and 1.0 kbp.

- Vector pNEA2

The 2.0 kbp *NheI*-*EcoRI* fragment of pKW1 (see Figure 5) is isolated and inserted between the two unique *NheI* and *EcoRI* sites in the tetracycline resistance gene of YIp5, where the latter was first digested by these two enzymes. The ligation product is introduced into *E. coli* and the transformants which are resistant to ampicillin and sensitive to tetracycline are isolated. The plasmid is isolated, as in the case of pBNA1, from one of its transformants. The structure of the recombinant plasmid obtained is verified by restriction. For example, digestion by *PstI* produces 2 fragments of 4.35 and 3.15 kbp; double digestion with *PstI/XhoI* produces 4 fragments of 3.15, 1.8, 1.75 and 0.7 kbp.

- Vector pXXY2

The 545 bp *XhoI*-*XbaI* fragment of pKW1 (see Figure 5) is isolated and inserted between the unique *Sall*-*NheI* sites in the tetracycline resistance gene of plasmid YIp5. The *XhoI* and *Sall* ends, on the one hand, and *XbaI* and *NheI* ends, on the other hand, are compatible for a specific ligation. The ligation product is introduced into *E. coli*, and the recombinant plasmid is isolated as in the case of pBNA1. The structure of the plasmid obtained is verified by restriction. For example, digestion with *EcoRI* + *NruI* produces two fragments of 4.5 and 0.96 kbp.

- Vector pXXK3

The 545 bp *XhoI*-*XbaI* fragment of pKW1 (see Figure 5) is isolated and inserted between the unique *Sall*-*XbaI* sites (polylinker at the N terminal of *LacZ*) of plasmid pKan21. The ligation mixture is introduced into *E. coli*, and the transformants, which are plated on LB medium containing X-gal and IPTG, are isolated as white colonies among blue colonies. When replicated on LB medium containing kanamycin, they grow well. These colonies are individually analyzed for their plasmid content. The plasmid obtained from one of the transformants presents the structure shown in Figure 6, which was verified by restriction. For example, digestion with *BamHI* + *PstI* produces four fragments: 2.5, 1.3, 0.55 and 0.19 kbp.

- Vector pBNB1/A3

The 1.9 kbp *BglII*-*NheI* fragment of pKW1 (see Figure 5) is isolated and inserted between the *BamHI*-*NheI* sites of YIp5. The recombinant plasmid is isolated as in the case of pBNA1. The structure of the plasmid is verified by restriction. For example, digestion with *PstI* produces 3 fragments of 3.15, 2.8 and 1.36 kbp; double digestion with *PstI/NheI* produces 4 fragments of 3.15, 1.8, 1.36 and 1.0 kbp.

- Vector pNEB1

The 2.5 kbp *NheI*-*EcoRI* fragment of pKW1 (see Figure 5) is isolated and inserted between the *NheI*-*EcoRI* sites of YIp5. The recombinant plasmid is isolated as in the case of pBNA1. The structure of the plasmid is verified by restriction. For example, digestion with *PstI* produces 2 fragments of 4.65 and 3.15 kbp; double digestion with *PstI/XhoI* produces 3 fragments of 3.15, 2.9 and 1.75 kbp.

3.2 The second type of recombinant molecules contains the totality of the sequence of pKW1. To obtain these vectors, pKW1 is linearized by a unique cut at a restriction site, allowing the introduction of heterologous DNA segments. Such segments can contain structural genes, included, for example, in expression cassettes and/or whole shuttle vectors, such as, notably, pKan21 or YIp5 (Figure 4).

Examples of this type of vectors are pKWC11, pKWS1 and pKWS14 (Table 2 and Figure 7).

- Vector pKWS14

The DNA of pKW1 is digested by the restriction enzyme *Sall*. Plasmid pKan21, described above, is also digested by *Sall* (the unique *Sall* site is localized in the cloning multisite present in the *LacZ* gene). The two plasmids are ligated by DNA ligase. The ligation mixture is used for the transformation of *E. coli* JM83 as in the preceding case. The suspension of the cells transformed is plated on LB agar containing X-gal and IPTG. The white colonies, among the blue ones, are harvested individually. They are resistant to ampicillin and kanamycin. Their plasmid content is analyzed on DNA minipreparations as above. Plasmid pKWS14, isolated from one of the transformants, contains form A of plasmid pKW1 and it has the structure shown in Figure 7. It is verified by restriction. For example, digestion with *BamHI* produces 3 fragments of 5.6, 2.6 and 1.2 kbp.

- Vector pKWC11

Plasmid pKW1 is digested with *ClaI*. Plasmid pKan21 is digested with *AccI*. They are repurified by treatment with phenol and precipitation with ethanol. The DNA of the two plasmids are mixed in approximately equal quantities and subjected to ligation with DNA ligase for one night. The ligation product is amplified in *E. coli*. The colonies of the transformants are white on LB medium containing Xgal and IPTG. They are resistant to kanamycin and ampicillin in the medium containing one or the other of these antibiotics. Plasmid pKWC11, isolated from one of the transformants, contains form A of plasmid pKW1 and has the structure shown in Figure 7. It is verified by restriction. For example, digestion of the plasmid with *BamHI* produces 3 fragments of 5.6, 2.9 and 0.9 kbp.

- Vector pKWS1

Plasmid pKW1 and plasmid YIp5 are digested with Sall. The mixture is repurified and subjected to ligation. The ligation product is introduced into *E. coli*. Transformants which are resistant to ampicillin and sensitive to tetracycline are obtained. Plasmid pKWS1, isolated from one of them, contains form A of plasmid pKW1 and it has the structure shown in Figure 7. For example, digestion of the plasmid with EcoRI yields two fragments of 8.3 and 2.7 kbp.

4) Construction of a strain CBS 6430 pKW1

K. waltii CBS 6430 was first transformed by the recombinant plasmid pKWS14 (Table 2 and Figure 7). The transformation method used is essentially that described by Chen and Fukuhara (Gene 69, 181 (1988)) using protoplasts. The transformants obtained are maintained for 75 generations on YPD agar medium 1 mg/mL G418 (YPD medium: yeast extract 10 g/L; peptone 20 g/L; glucose 20 g/L). They are then transferred to a liquid YPD medium without antibiotic, and maintained for 10 generations.

Under these conditions (without selective pressure), plasmid pKWS14 is progressively lost. The colonies which are sensitive to G418 and which appear are collected and individually tested for the presence of the plasmids. The test consists of the extraction of cellular DNA, followed by electrophoresis of these DNAs on agar gel. The presence of plasmids is determined by staining with ethidium bromide. Among the colonies which have become sensitive to G418, 25% were shown to lack any plasmid. One of these colonies was kept as a strain of *K. waltii* which lacked plasmid pKW1, and it was called KW18.

5) Transformation of different yeasts

5.1 Transformation of *S. cerevisiae*

Among the different vectors described in Tables 1 and 2 and in Figures 4 and 5, some of those containing the marker URA3 were used to transform an auxotrophic strain *ura3* of *S. cerevisiae* (strain S150-2B: Mat a, *ura3*, *leu2*, *trp1*, *his3*, 2 μ).

The transformation method is essentially the one described by Sherman et al. (Yeast Genetics, Cold Spring Harbor, NY, 1986).

The results obtained are indicated in Table 3. They show that the vectors of the invention are capable of transforming the yeasts of the genus *Saccharomyces*.

5.2 Transformation of *K. waltii*

The transformation of *K. waltii* was carried out with vectors which carry the marker for kanamycin resistance.

The transformation method used is essentially the one described by Chen and Fukuhara (Gene 69 (1988) 181) using protoplasts. It is clear that any other technique which allows the introduction of a DNA fragment in a microorganism can be used.

The results obtained are presented in Table 4.

They show that the vectors of the invention are capable of transforming the yeast *K. waltii* with a high frequency.

Moreover, the stability study described in Figure 8 shows that vectors can be obtained from pKW1 presenting a stability of 100% after 50 generations of growth in a nonselective medium. This is perfectly illustrated by vector pKWC11. This study also shows that it is preferable, to obtain a relatively high stability, to use the vectors which comprise only the replication origin of plasmid pKW1 in host cells having a resident pKW1 plasmid.

5.3 Transformation of other yeasts

Vector pKWC11, which is highly stable and autonomous in *K. waltii*, was used to test the transformability of different yeast species, notably those belonging to the genus *Kluyveromyces*.

The results are presented in Table 5.

The presence of vector pKWC11 in the transformants was verified by electrophoresis.

All of these results show that the range of host species for the vectors of the invention can be very large, beyond the genus *Kluyveromyces*.

6) Use of the vectors of the invention for the production of heterologous proteins

6.1 Interleukin-1 β :

6.1.1 Construction of an expression and secretion vector of IL-1 β derived from pKW1 (Figures 9 and 10).

- Vector pXXX3 (Table 1, Figure 6) is linearized by EcoRI, and the ends are filled with the Klenow fragment of DNA polymerase I of *E. coli*. A synthetic "linker" (5'-GCGGCCGC-3') forming a restriction site which is recognized by the enzyme NotI is added by means of T4 ligase, and the vector so obtained (pXKN18) is purified after its amplification in *E. coli* (Figure 10).

- An expression cassette of IL-1 β is prepared, consisting (a) of the regulated promoter PHO5 originating from *S. cerevisiae* (Bajwa et al., Nucl. Acid. Res. 12 (1984) 7721-7739), (b) the gene of human IL-1 β (Jung et al., Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 139 (1988) 129-146) preceded (c) by a synthetic sequence corresponding to the signal sequence of the killer toxin of pGKL1 of *K. lactis* (pre region of the gene of the alpha subunit) (Stark and Boyd, EMBO J. 5, (1986) 1995-2002), and (d) by the terminator PHO5. The expression cassette was isolated from the vector pSPHO5-IL14 whose construction is described in the patent EP 361991. The cassette

was prepared as follows: At the 5' end of the gene coding for the mature part of IL-1 β , the following synthetic sequence is inserted, in the form of an EcoRI fragment:

MetAsnIlePheTyrIlePheLeuPheLeuLeuSerPheValGlnGlyLysArg
 5'-AATTATGAATATATTTTACATATTTTGTGCTGTCATTTCGTTCAAGGTAAG-3'
 3'-TACTTATATAAAATGTATAAAAAACAAAACGACAGTAAGCAAGTTCATTTTCTTAA-5'

The last codons added (Lys and Arg) form a potential restriction site which is recognized by the endopeptidase Kex1 of *K. lactis* (Tanguy-Rougeau et al.; FEBS Lett. 234 (1988) 464). This sequence was fused to the IL-1 β gene by the EcoRI site, forming the following junction:

Gly Lys Arg Ile His Met Ala
 5'....GGT AAA AGA ATT CAT ATG GCA3'

Alanine (GCA) corresponds to the first amino acid of mature IL-1 β . Arg-Ile-His-Met corresponds to an EcoRI-NdeI "linker" introduced to facilitate the cloning (see EP 361 991).

The entire cassette is put in the form of a NotI fragment by the addition of a corresponding linker (5'-GCGGCCGC-3').

- The secretion cassette of IL-1 β is inserted, at the NotI site, in pXKN18. The resulting vector is called pXPHO5 (Figure 10).

6.1.2 The strain *K. waltii* CBS 6430 is transformed with vector pXPHO5, under the conditions described in Example 5.2.

6.1.3 Expression of IL-1 β :

The transformed cells are cultured at 28°C, in the absence of G418, in the liquid medium LPi (low mineral phosphate content) and the medium HPi (high phosphate content), prepared according to Chen and Fukuhara (Gene 69 (1988) 181-192), for 4 days. 50 mL of culture are centrifuged and the supernatants are filtered through a Millipore membrane (0.22 μ m). The proteins are precipitated by the addition of ethanol at the final concentration of 60%. The precipitates are dissolved in 2 mL of Laemmli buffer (Nature 227 (1970) pp. 680-685) and 20- μ L samples are used for SDS-PAGE analysis according to Laemmli (document cited above). After the electrophoresis, the proteins are transferred to a nitrocellulose sheet, and treated with a polyclonal anti-human IL-1 β rabbit antiserum. The blot is then treated with a second biotinylated

anti-rabbit polyclonal antibody (Vectastain ABC ImmunoPeroxidase Kit, Vector Laboratories). The antigen-antibody complex is developed according to the protocol of the supplier.

Figure 11 shows that a protein having an apparent molecular weight of 21 kDa is secreted by the yeast transformed by pXPHO5. The protein is specifically recognized by the anti-IL-1 β antiserum. This protein is not synthesized by the yeast transformed by the control vector pXKN18 (without IL-1 β cassette). The secreted protein corresponds to the glycosylated form of IL-1 β , which is demonstrated by the reduction of the apparent MW after treatment with the enzyme endo-N-acetylglucosamidase H (Figure 11, lane 3). This host/vector pair *K. waltii*/pXPHO5, which is not yet optimized, secretes approximately 5 mg of IL-1 β per liter of culture. The level of secretion of IL-1 β by *K. waltii* is higher in the LPi medium than in the HPi medium, which suggests that the activity of the PHO5 promoter is regulated by the phosphate in *K. waltii*, as in *S. cerevisiae*.

6.2 Human serum albumin:

6.2.1 Construction of plasmid pYG140 (Figures 12-14).

A plasmid was constructed which comprises:

- an *E. coli* replicon,
- the gene aph under the control of the promoter k1 of the killer toxin of *K. lactis* (EP361911) in which the HindIII site was eliminated by directed mutagenesis, and
- the gene bla, which confers resistance to ampicillin.
- the gene aph, under the control of the promoter k1, is isolated from plasmid pKan707 (EP361991) in the form of a fragment PstI, which is cloned in the equivalent site of the phage M13mp7. The resulting plasmid is called pYG64 (Figure 12). The HindIII site present in this gene was destroyed by direct mutagenesis according to the method described by Taylor et al. (Nucl. Acid. Res. 13 (1985) 8749). The resulting plasmid is called pYG65. The oligodeoxynucleotide having served for the mutagenesis has the following sequence: 5'-GAAATGCATAAGCTCTTGCCATTCTCACCG-3', and it allows the transformation of the triplet CTT coding for leucine 185 in CTC. To construct plasmid pYG70, the part containing the bacterial replicon of vector pKan707 was isolated by digestion with the enzyme EcoRI and recircularization with T4 DNA ligase to obtain pYG69. The fragment PstI present in the latter vector containing gene aph was then replaced by the mutated equivalent fragment originating from pYG65. The resulting plasmid is called pYG70 (Figure 13).

This plasmid is then digested by EcoRI and relegated in the presence of an EcoRI-NarI-EcoRI adapter containing the following sequence: 5'-AATTCGGCGCCG-3'.

The plasmid obtained is called pYG140 (Figure 14).

6.2.2 Introduction of an expression cassette for albumin (Figure 14)

The gene coding for preproSAH under the control of the promoter and the terminator of the gene PGK of *S. cerevisiae* was isolated in the form of an Sall-SacI fragment from an expression vector pYG19 (EP361991). This fragment was introduced into the corresponding sites of plasmid pYG140 to generate plasmid pYG141.

6.2.3 Construction of expression vector pYG142 (Figure 15)

Plasmids pYG141 and pKW1 are digested by the enzymes NarI and ClaI, respectively. After the ligation, 4 recombinant plasmids are obtained because of the existence of 2 forms, A and B, of pKW1, and of the orientation of the pKW1 part with respect to the pYG141 part.

Figure 15 describes the restriction map of one of these 4 plasmids: pYG142, containing the form B of pKW1.

The other plasmids are called pYG143, pYG144 and pYG145.

One sample of the strain *K. lactis* CBS 6430 was deposited at the CBS in Baarn (Netherlands) pursuant to the conditions of the Treatise of Budapest, on June 4, 1991 under the number CBS 290.91.

Table 1

Vectors	Fragment of pKW1	Shuttle vector	Marker
pBNA1	BglII-NheI 2.4Kb	Yip5 *BamHI-NheI	<u>URA3</u>
pNEA2	NheI-EcoRI 2.0kb	Yip5 NheI-EcoRI	<u>URA3</u>
pXXY2	XhoI-XbaI 0.55 kb	Yip5 Sall-NheI	<u>URA3</u>
pXXK3	XhoI-XbaI 0.55 kb	pKan21 Sall-XbaI	<u>Kan^R</u>
pBNB1/A3	BglIII-NheI 1.9 kb	Yip5 BamHI-NheI	<u>URA3</u>
pNEB1	NheI-EcoRI 2.5 kb	Yip5 NheI-EcoRI	<u>URA3</u>

Table 2

Vectors	Linearization site of pKW1	Shuttle vector	Marker
pKWS14 Pkwcl1 PKWS 1	Sall ClaI Sall	pKan21*(Sall) pKan21 (AccI) Yip5 (Sall)	Kan ^R Kan ^R URA3

Table 3. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by vectors derived from pKW1

Vectors	Transformants Ura+ per µg of DNA
pKWS1	4 400
pBNA1	1 200
pBNB1/A3	7 600
pXXY2	4 000
pSK1	4 500

Table 4. Transformation of *Kluyveromyces waltii* by vectors derived from pKW1

Vectors	Replication support	Transformants G418-resistant per µg of DNA	
		pKW1 ⁺	pKW1 ⁻
pKWC11	pKW1 total	36 00 (98 %)	8 000 (100 %)
pXXK3	XbaI-XhoI 540bp de pKW1	35 000 (49 %)	10 000 (2,8 %)
pKWS14	pKW1 total	10 000 (92 %)	8 000 (29 %)

Table 5. Transformation of yeasts of the genus *Kluyveromyces* with the vector pKWC11

Species	Strain	GC%	Frequency of transformation per µg of DNA	Stability of the transformants (%)
<i>K. waltii</i>	CBS 6430	45.6	2400	100
<i>K. thermotolerans</i>	CBS 6340	46.2	4000	25

Claims

1. Plasmid pKW1 isolated from the strain *K. waltii* CBS6430, or any fragment or derivative thereof.
2. Fragment according to Claim 1, characterized in that it is a genetic element.
3. Plasmid characterized in that it comprises all or part of the sequence presented in Figure 3 or a derivative thereof.
4. Cloning and/or expression vector, characterized in that it comprises all or part of plasmid pKW1 of *K. waltii* CBS 6430 represented in Figure 1 or a derivative thereof.
5. Vector according to Claim 4, characterized in that it comprises a genetic element of at least plasmid pKW1.
6. Vector according to Claim 5, characterized in that it comprises the replication origin of plasmid pKW1.
7. Vector according to Claim 4, characterized in that it comprises the totality of plasmid pKW1.
8. Vector according to Claim 4, characterized in that it comprises all or part of the sequence presented in Figure 3 or a derivative thereof.
9. Vector according to Claim 4, 7 or 8, characterized in that plasmid pKW1 is linearized at the level of a functionally neutral restriction site.
10. Vector according to Claim 9, characterized in that it contains restriction site present on plasmid pKW1, or one which was artificially introduced to it.
11. Vector according to Claim 10, characterized in that it contains a restriction site artificially introduced into an intergenic region, and preferably in the region located between the genes B and D, or in the region located between gene D and IR2.
12. Vector according to Claim 10, characterized in that plasmid pKW1 is linearized at the level of the sites ClaI(1), PstI(4608) or EcoRV(3072), the positions being given with reference to Figure 3.
13. Vector according to any one of Claims 4-12, characterized in that it contains, in addition, a heterologous DNA sequence comprising a structural gene which is at least under the control of signals allowing its expression.
14. Vector according to Claim 13, characterized in that the expression signals consist of one or more elements chosen from promoters, terminators, and secretion signals.
15. Vector according to Claim 14, characterized in that the promoters can be regulated.
16. Vector according to Claim 14, characterized in that the promoters are derived from yeast genes, and preferably from glycolytic yeast genes.
17. Vector according to Claim 13, characterized in that the structural gene codes for a polypeptide of pharmaceutical or agro-food interest.

18. Vector according to Claim 13, characterized in that the structural gene codes for a hybrid protein.

19. Vector according to Claim 13, characterized in that the structural gene(s) is (are) genes involved, at the genetic or biochemical level, in the biosynthesis of a metabolite.

20. Vector according to Claim 4, characterized in that it contains in addition an *E. coli* replicon.

21. Vector according to Claim 4, characterized in that it contains in addition at least one selection marker.

22. Recombinant cell containing a vector according to any one of Claims 4-21.

23. Cell according to Claim 22, characterized in that it is a yeast cell.

24. Cell according to Claim 23, characterized in that it is a yeast of the genus *Kluyveromyces* or *Saccharomyces*.

25. Method for the preparation of a polypeptide, characterized in that a recombinant cell is cultured according to one of Claims 22-24 and the produced polypeptide is recovered.

26. Method according to Claim 25, characterized in that the polypeptide is chosen from enzymes (such as, notably, superoxide dismutase, catalase, amylases, lipases, amidases, chymosine, etc.), blood derivatives (such as serum albumin, alpha- or beta-globin, factor VIII, factor IX, van Willebrand factor, fibronectin, alpha-1 antitrypsin, etc.), insulin and its variants, lymphokines (such as interleukins, interferons, colony stimulation factors (G-CSF, GM-CSF, M-CSF...), TNF, TRF, etc.), growth factors (such as growth hormone, erythropoietin, FGF, EGF, PDGF, TGF, etc.), apolipoproteins, or antigenic polypeptides for the preparation of vaccines (hepatitis, cytomegalovirus, Epstein-Barr, herpes, etc.).

27. Method according to Claim 26, characterized in that the polypeptide is human albumin or one of its variants or precursors.

28. Use of a recombinant cell according to one of Claims 22-24 as a catalyst in a bioconversion reaction.

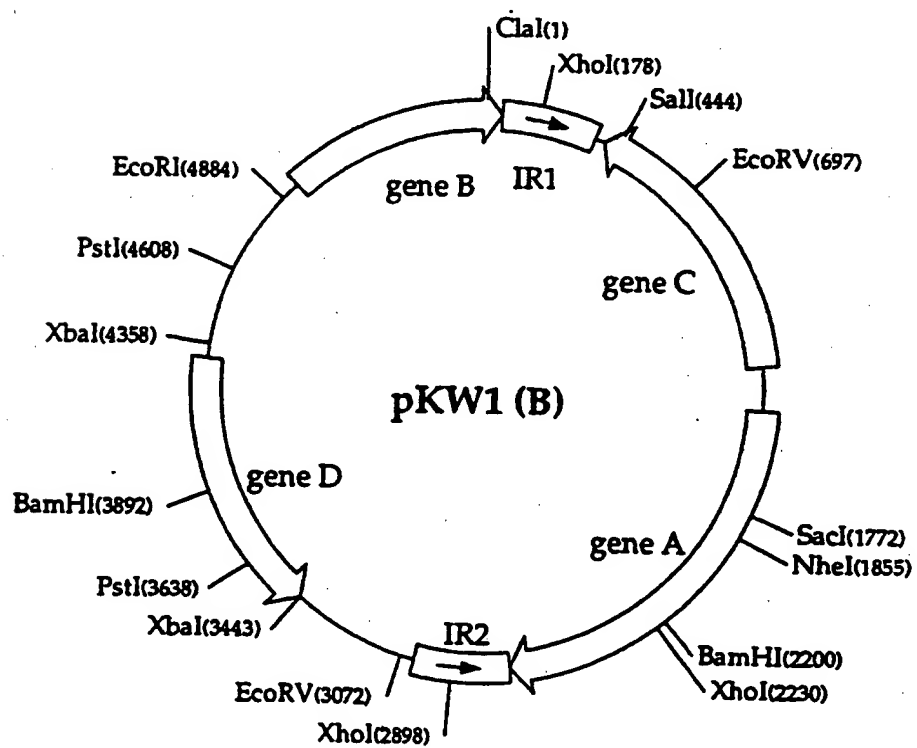
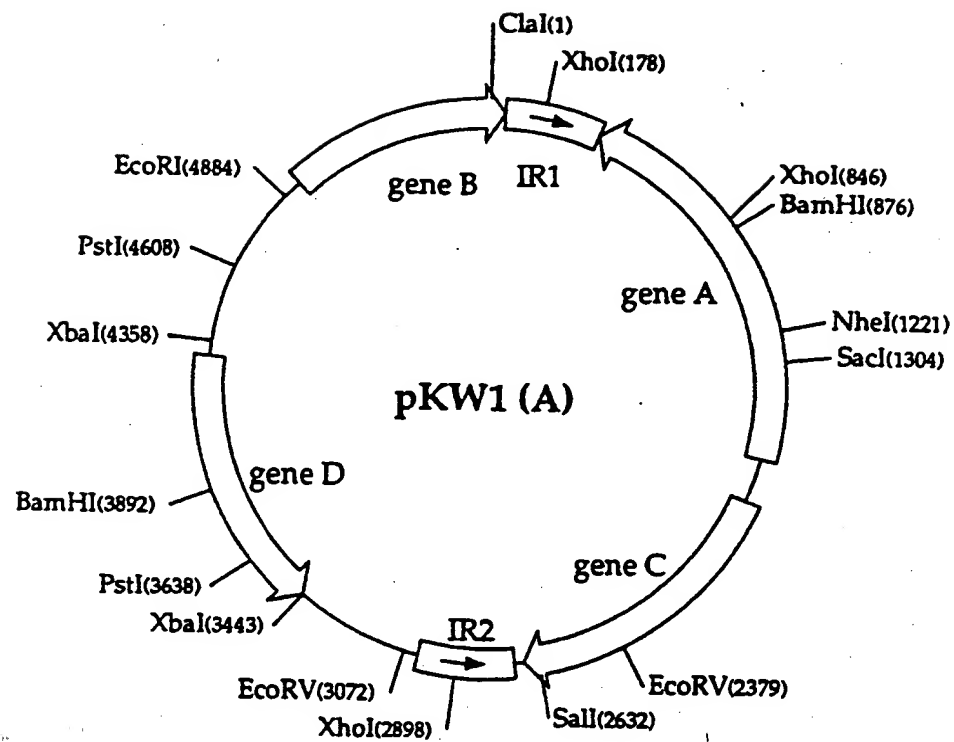


FIGURE 1

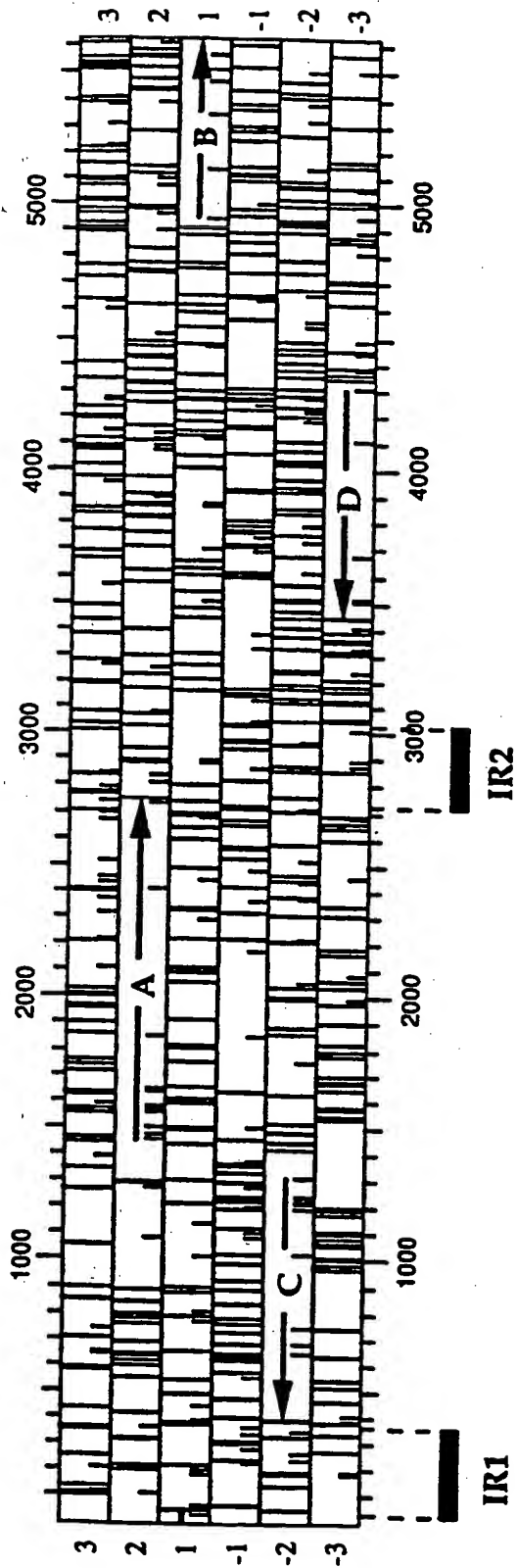


Figure 2

	10	20	30	40	50	60	
1	ATCGATTGCC	AGCAACAGGG	TTTTGCGCGT	ATGTCTCTTG	TGGATACTAT	GTAAACAAAA	60
61	CAATCAATGT	ACAAAGAGCA	CAGCGGCCGG	CAGGTGGGAG	GACCCTCTGA	TGAGCCGGGG	120
121	ATATGGCGCT	CCCGCGCGTC	TAATATCCGG	ATTGGACTGG	AGGAGGACCA	AGGTTTCCTC	180
181	GAGGTCATGT	GCCGCATCAT	GAGGGACGAA	AAATGGTAAG	GAATAGACCA	TTCCTTACCA	240
241	TTTTTCGTCG	CCCGTGAGAT	TTTCCCATTT	CCCGTTCCTT	ACCATTTTTT	GTTCCGCACG	300
301	ACCCATATCAC	ATTGTATATT	GAAATCTACT	TCCCTTCATA	CCGCTTGGCC	ATCGCGTAGG	360
361	AATGAACATA	TGTAGCCCCCT	CTAGTTCCTC	ATGTTGTTCT	CAATCGACCC	TTCCATCGTG	420
421	AAGGGATCTC	CTCTTGAGGC	AATGTCGACG	TTCGTACCCT	CTTCTACGG	GTCACGGGTT	480
481	CGTCTGTAAC	ACTTCTTCTT	GGTCTCCCTC	GGCCTCTTTT	ACTTGGCTGT	GGCCTGGTAT	540
541	TTTTGAGTTC	ATCGAATAGG	CGCGGGTTTT	CTTTTACTTG	AGGCCAGTCT	TGAATCTCTG	600
601	AACCGAGAGA	GGTTAGAGAA	GTTATTCTTT	TTAGATCATT	TAACATGTCC	TTGATGTCTT	660
661	CTGGCGTTGT	TTCGAAGCAC	ATCAGTCCCC	TTGAGCGATA	TCTGTCGTAA	TTTGCCAGTA	720
721	TTACGTTGTG	CGCTTCTTCC	ATGTTTTTTCAG	GGGCCACATG	CTTTAATGCC	TGCACTAAAA	780
781	CACTTCTGAC	AAGTGACCAA	TCTGCGAATG	CAGGCTCGTT	CGCCAATATC	AATCTCTGTA	840
841	GAGGAACACC	ACGATAGCTT	GTTGTGCCCT	TGCAGATAGT	GTTCAAGAAT	AGACTGAGGT	900
901	AGCCACGTAC	GTCGAGCTTT	ACAGACCTGG	TGCCAACGCC	AGAAAGAAGG	GCGAAGGGGT	960
961	CCTCTTCAAT	CGGAAAACGG	GTCAGGCTAT	CCACACGGTA	CTCTCTATAT	GTACTIONGAG	1020
1021	TCATCGTCGT	GTACTIONGCG	AAGTGACGGC	CGTGCGGATT	ATAGTCAATC	TGGAAAGAAT	1080
1081	CCTGCTCATG	TGGCTCTTTC	TCCCCATTAT	CCTCTTCAGA	GTTACGCGAG	CCAGATGGCA	1140
1141	GCTCGGCTGG	CTCTCGCAGG	TACGTGGGAT	CGGGCTCACC	TCGATCCACC	GTCATCTCAT	1200
1201	CAAGATTGCA	CATAATCTGC	ATCAGTCTCA	ACGTCAATATC	GACCGCGGAA	AAGGCGTCCG	1260
1261	AGTAGGAAAC	ATGCAGTTTG	GAAAGGTCTA	ACAGCTTGAG	GCAGTGCATC	TTGGCCTCTC	1320
1321	TCTCTGTCAG	TCTTTCTCTG	TTTTGACCAA	TTTTTCTCAA	GTGTATTACA	TTTGTCTCTT	1380
1381	GGATTGCAAA	AATGTTGCGA	GTACTIONGCGT	TTCTCGTTCA	AAAACAGCGT	TCGCTGAAAA	1440
1441	TTTAGGAGTT	CAGATGCAAC	GCGTAGTGCA	AATGGAGGAT	TCAAGTTGCA	GTAACAATAA	1500
1501	CATGGAACAC	CAAGGATCAG	TGTTTCGAGGA	GCTTATCTCC	AAAAATCTTA	TGAGCCTGAT	1560
1561	GGAAGAATTG	ATGTCTATGC	TCACTAATGA	GAAGGAGTTC	CAACGTGAAA	GGTTCGCGTC	1620
1621	TCTCCTAGCC	TACATGATAA	TGGCTACTGG	TGAATTGGAA	GAGAAAAAGC	TCAGTACATT	1680
1681	TACCAAGTAT	TCCCGACGGA	TCAGGCAGAC	GGTAGAGTTC	GACAGCAACA	ACCAAATCGT	1740
1741	AAGATTTGAG	TACCATTGGA	AGAATCCAC	AGAGCTCAAG	GAGACGCTGG	ACAAGGCCCTT	1800
1801	TAAACCTGTC	GTGTTTGAAA	TCAAGTCCAA	AAAGAAGGTT	GTCTCCATGC	TGGAGCTAGC	1860
1861	TGCGAAGCTC	GACAAAAGGG	GATCAGATTC	AGCGGGTGGT	ACGGTAGCTA	GTGAGGTCTC	1920
1921	GAAGCTTGTC	CGGGAGGAAG	AAATTTGGCT	TCTTCTCGTG	AACGTGAAGA	ATACTATCCA	1980
1981	GGAAAAGGTG	CGCAAATCAT	CGCTAAGAGC	GGAATTGACG	TATATTTTGA	CAGCCTCATT	2040
2041	CTTCAATTGT	TGCAGACATA	GCGATCTCAG	GAACGCAGAC	CCCGCAACAT	TTGAGCTGGT	2100
2101	GCCAAATAAG	TATGTGGGCC	ACGTTGTCCG	GGTTTGGTG	TGCGAGACCA	AGACCCGAAA	2160
2161	GCCGCGGTTT	ATATACTTTT	TCCCTGTCAA	TACGGCCGCG	GATCCTCTAG	TAGCGCTTCA	2220
2221	TGATTTGTTT	TCGAGCACGT	TTCCTTCCAA	AAAGAGTCGG	ACGTCCGAAA	GAAAGCAGGA	2280

Figure 3 (a)

2281 ACAGGAATGG CAGATCGTTC GCGACGCATC AATCAACAAC TATGACCGGT TTGTTGGTAA 2340
 2341 GCACGCTACG GAATCTGTCT TTGCCATCTT GCATGGTCCC AAATCACACT TGGGCCGGCA 2400
 2401 CTTGATGAGT TCCTACTTGG CGTATACCCA CCATGGGGAA TGGGTCTCAC CATATGGGAA 2460
 2461 TTGGTCAGCT GGGAAAGGAA CCATTGAAAG CAGCGTGGCA AGGGCCAAGT ACGCACATGT 2520
 2521 TCAAGCCGAG ATCCCAAGCG ATCTTTTCGC CTTTCTGTCT CAGTACTATC AGGAATCAAA 2580
 2581 ATCGGGCGAT TTCGAGCTTA ACGACACCAG CAAAGACCCA ACAAAGCTGG TACGGCACTC 2640
 2641 GGCTAGTCAA CTGGAAATCA ATCGAACCTA TGGTCCATGG AGTAGATTGG TTAACAAGGA 2700
 2701 TGTTTTAGGC TTTGTTTATT CCTACGCGAT GGCCAAGCGG TATGAAGGGA AGTAGATTTT 2760
 2761 AATATACAAT GTGATAGGGT CGTGCGGAAC GAAAAATGGT AAGGAACGGG AAATGGGAAA 2820
 2821 ATCTCACGGG CGACGAAAAA TGGTAAGGAA TGGTCTATTCT CTTACCATT TTCGTCCCTC 2880
 2881 ATGATGCGGC ACATGACCTC GAGGAAACCT TGGTCCTCCT CCAGTCCAAT CCGGATATTA 2940
 2941 GACGCGCGGG AGCAGCCTAT CCCC GGCTCA TCAGAGGGTC CTCCCACCTG CCGGCCGCTG 3000
 3001 TGCTCTTTGT ACATTGATTG TTTTGTTTTA GTATTACCTG ACAATCATTT TATATTTTGT 3060
 3061 CAGTATTTCT TGATATCTGG CCCAATGAA AGTACAAATA CAAGTACAAG TACAACACCT 3120
 3121 ATTCATTGTT ACCGTATCTC TATACTATTA TCCTTATTTT CTGCCTAATT AACTACTTTC 3180
 3181 TACCGGTGCG TTCTTAAAGC TGAGTAGGCA CTTAGCCCG AAGTGAATAT CGCTGGCCTC 3240
 3241 ATTATCTGTT TGTTGTATGG CCAATGAAAC TCCAACCGAT TTGATCCACT TGCAAGGACC 3300
 3301 GTAGGATAGA CTTATTTTTA CCATCCCATT ATCTGTGCAG TGGACACCTC TGTTTATCTT 3360
 3361 TACCCGCCCT TCAGAGAACA TAATCTGTCT TACAAAAGAG TAGACCTCAT TTTTGGCGAG 3420
 3421 AAGCCTCTTC TGTTTGACCT CATCTAGAAG CTTTGGGCT CTCCCAGCGC AATCAGATAG 3480
 3481 TCTTGTGAGA GTGTCCTCTT CGTCACCATG CTCATCAGAA GGAGCTGGTT GCGTTCCAAT 3540
 3541 TGAGAAAGCT CGTCCCAAAA GGCTGCATGG TCTATAGGTG GTCCCGAACC CGAGGATTCA 3600
 3601 CCTTGAGACT CATTGTCCAC AGTAGGCTCC TGATCCTCTG CAGCAGCCGC TTGCTGAATG 3660
 3661 GATTCTGCTC TTGACATTAC CATTTCGAGA AGCCATAGTC TTCGGATGGT TCTAGCAGAT 3720
 3721 CTTTCAACAT CCAAACTGGA ACCGAACCAT TGCCGACAAC TTATTCTAAC CTCAGCTTTT 3780
 3781 GAGAGGTTCT CATACTTGGA TTGTGCAGCC TCAAGATCCG TAAGTTCGGT GAAGAAATCT 3840
 3841 AAAGCTTCGC GTTTTGGACC TAACCGAATG ATGATTGGGT GCCGTTTTCG TGGATCCAGA 3900
 3901 AATGGTGTAA GCTCCTCTAT ACTATCATTC GTGGGACACT CTATCCCTTC CCCAATATGC 3960
 3961 TTCTTTACAA TAGAAGGTAG CTGCGTATAC TTGTTCCGAA CAACAAAGAT GTGACTCTCT 4020
 4021 AGCCGCTTTA CTATTGTGTT CAACACAACG TAGGGTTTTG GCCACTCAA TGTAAATTCT 4080
 4081 GATCGAGCTG CTGATGCTGT GTTCTTGTG ATCATGTATG AATAGTAGAA CAATGCCAAT 4140
 4141 TGAGGATGCT CACTGTATTC CTTAGGCAGT TTGGTGCTGC CATAAGGTGA CACCAGCTCC 4200
 4201 TTTAGCTGTG GAACATAGAG TACATCAACA GTTCCTACTA GACAACATTC CTTGAGACAA 4260
 4261 TTATGATAGC CATCATGGTC GGTATCTTA GGTATTTTT GAGCTTCACT CATCTTCGAA 4320
 4321 GCAACCGTGA TAGATTGAT TGAAGTTCAA ATTCTTATCT AGATGGTGTA TTTGTTTATC 4380
 4381 ATAATTACA ATACAGTCTG TTTTAATTG CTCGAAGTTG CAGTGAAAGA TGTA AAAAGG 4440
 4441 GGCTTCATTT TGCACACAG ACTTACCCTG ATGTAAAAA TTTTCATCAT AAAAGCAATT 4500
 4501 TCTCGTATAC AAAATGCAGT TTGTTTCGTA TACAGCAAAG CATAGAATAC ACTGTACACT 4560
 4561 GCATTTTAC TACAAGAAAA GTTTTTTTT CTGCTGTGAC TGAATGCTG CAGCAGTACC 4620

Figure 3 (b)

4621 TAGATAGAAA AATGGCATAA AACTGAAATT TTATAGTCAT TTTTCGTGTC TTTTCATTCAA 4680
 4681 TTTTCTCTCG CAAAAGTTTT CTACAAAAGC AGTCAAAATT GCAATAAGTA TACACTAATT 4740
 4741 ACAAGGCGTC TGAGCGCGTG ACTTGAGCGC GTGACGTAAT CGCGAGCTAC GAAAGTTGTT 4800
 4801 TGGGCCTCAG ACATCGGATC GACAGAAGAG GTAAGAATAT TGGGAAAGTA CATTCAATTA 4860
 4861 CCACAACAAT CGAGAGATTA GTGGAATTCA GTCATTAATG AAAGGTAGGG TAGTCCGCCT 4920
 4921 ACTCTTAGTT CTACATTCAG AATACGCATG CAGTCCTCAA GTTCTGATGA AGACGACCTA 4980
 4981 ATTGACCCTA TAATTCATCC CAAATCGTTC TATAGGGCGG CTAACGAGAT ACCGAGAGAC 5040
 5041 TTTTGGTTG CGATCCCAT CAGCGCCTAT GTTTTAGCG TATTTGCTAA ATCAGTACGA 5100
 5101 GATGACTTAC AGGGGCATT AACGGCGCGA GATATGGCAT TAGCTTATCG TGAACGGCAG 5160
 5161 TACTTTCACA GACGCTGGGA GACACGAAAC GACCAGCTTG AGATCCCAGA CTGGTCTGAG 5220
 5221 ATCCCAGAAT GGTCTCTCGG GTTACTGGAT CGCCCTCCTT GTATCACTGT GGATCTAGCA 5280
 5281 AGAGAACTGC GCGAACTATC TCAAAAATGG ATCGGAGCAT TCGATCTGGG ATCGAAGATG 5340
 5341 TCTGGCAGGC TTCTTCTACA GCTTCTGTAC ACCCAGCTGT CATGCCCAA TGAGGCTGTT 5400
 5401 TTCAATAAGC TTTACTGCCT CGTCAAACTA CTAAACAAGG ACGTAAATCG TGCGGACCGA 5460
 5461 GCCCTTATGG ACTCTGTATT GAGACCACTT TTTGTCGAGA ATCCATACAT GGGTGAAC TA 5520
 5521 GATGAAGAAA TACTTGATAA GATATGGTCC AATTGACTG AAATGAGAAG TCAAGAGTGG 5580
 5581 AAACGTATAG CGGAAGCGTT GTCAGGCGAG AATAATGAC 5619

Figure 3 (c)

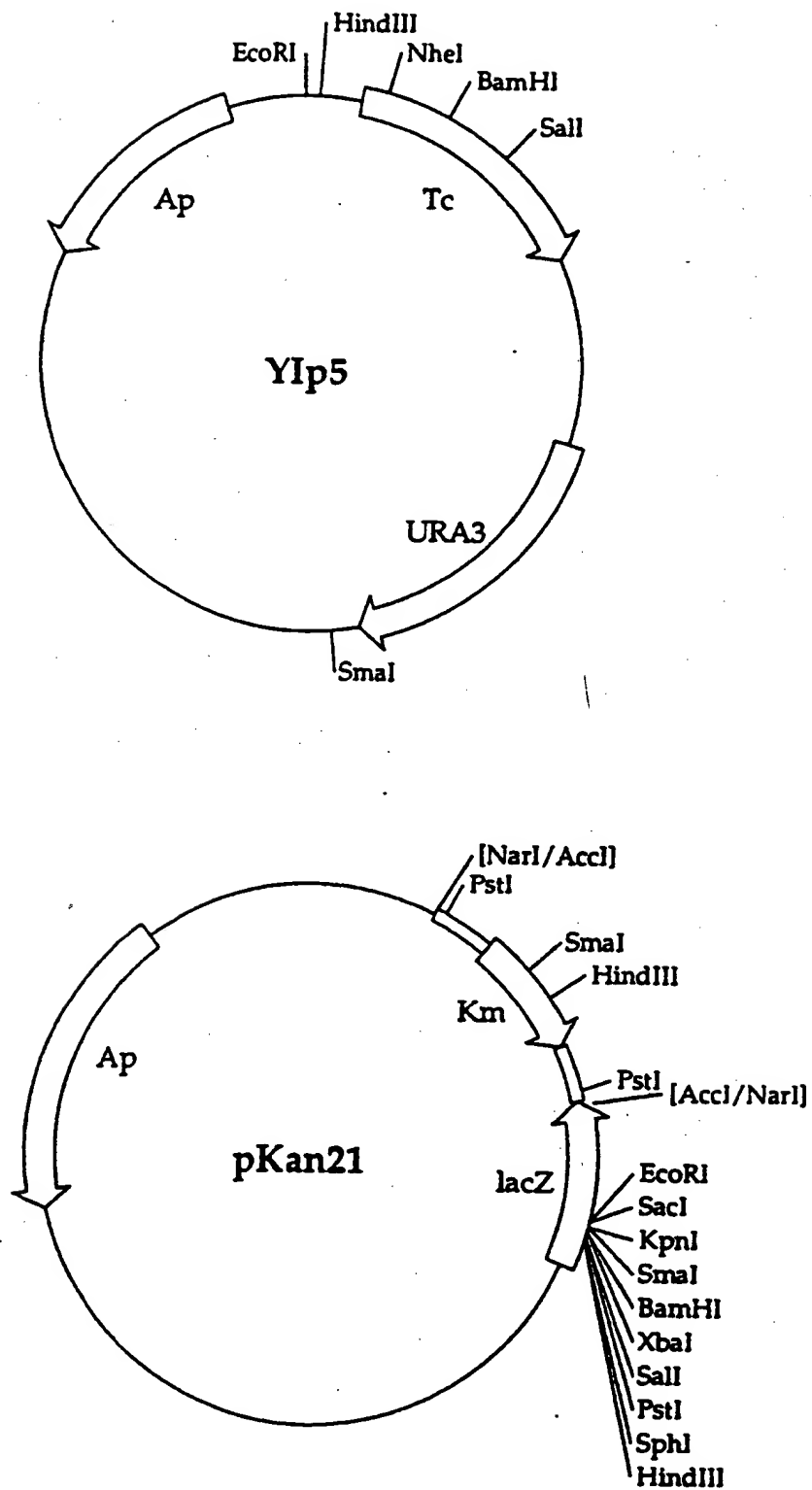


FIGURE 4

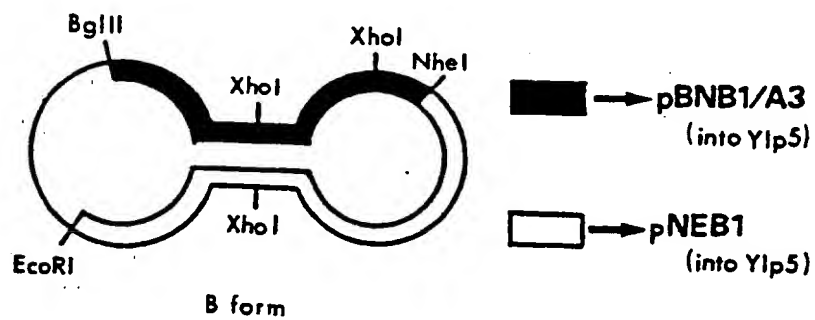
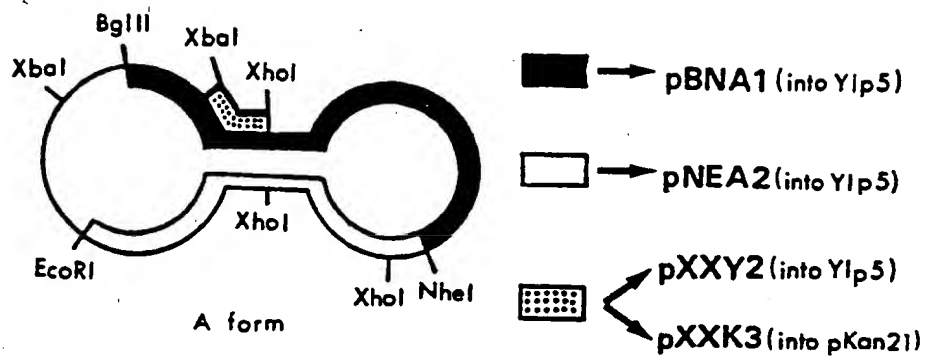


FIGURE 5

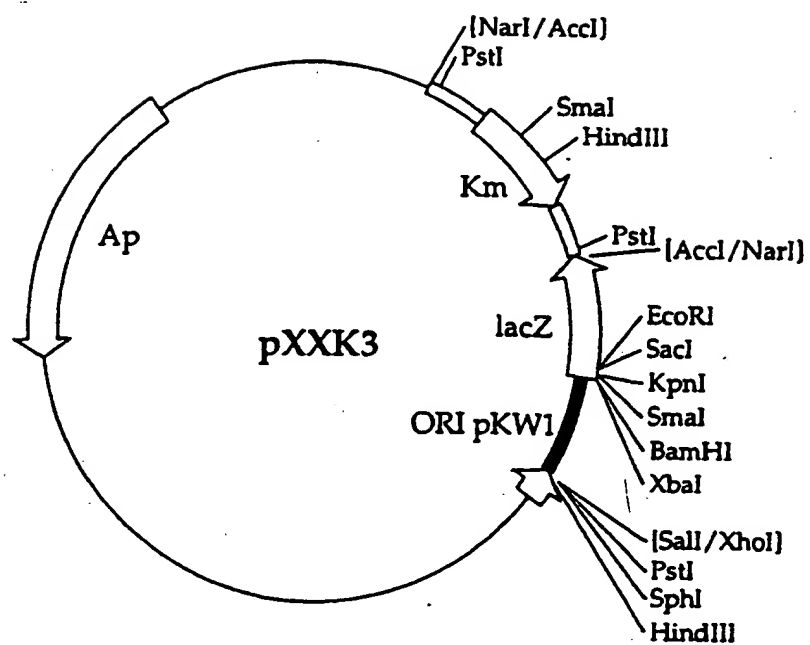


Figure 6

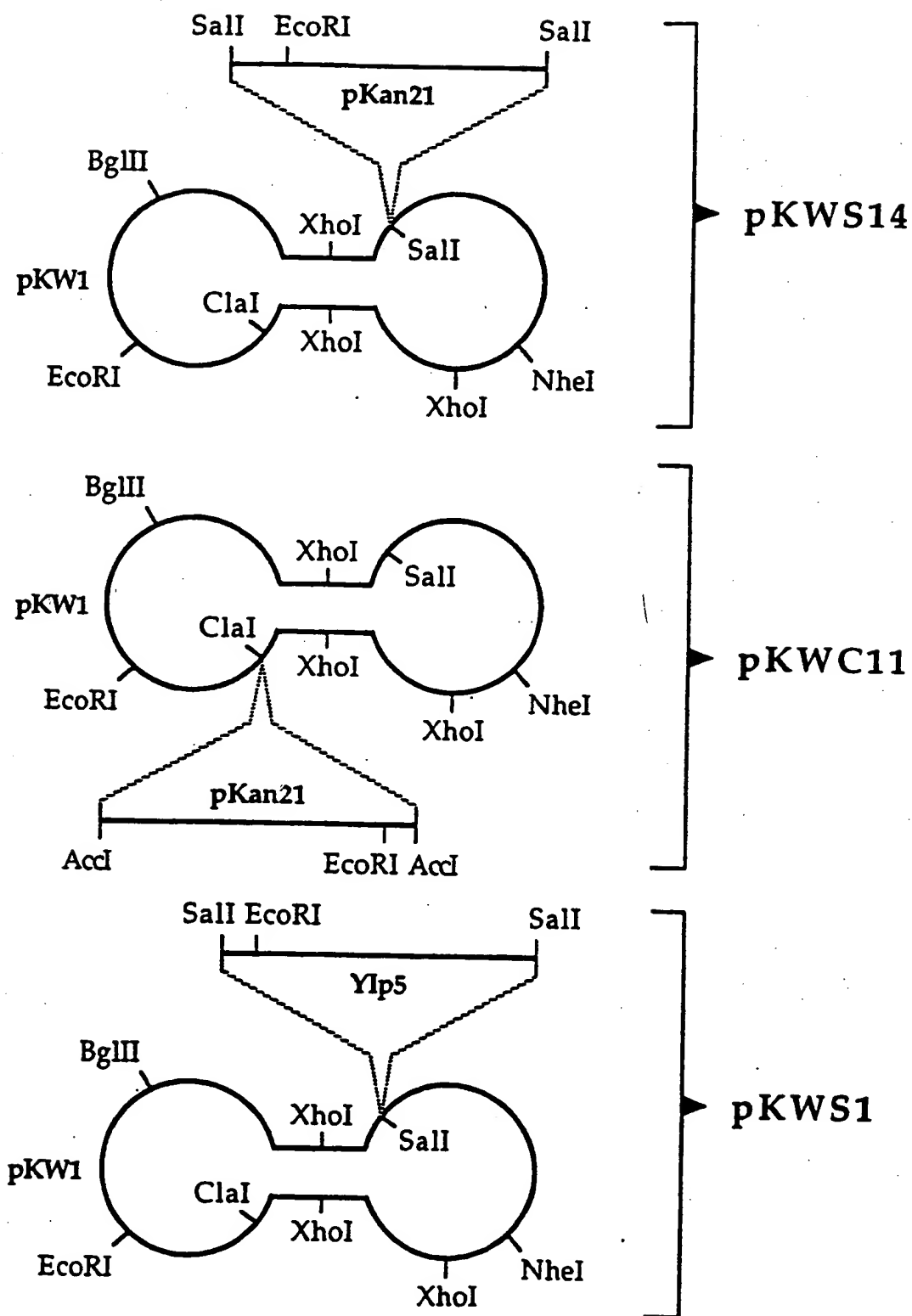


Figure 7

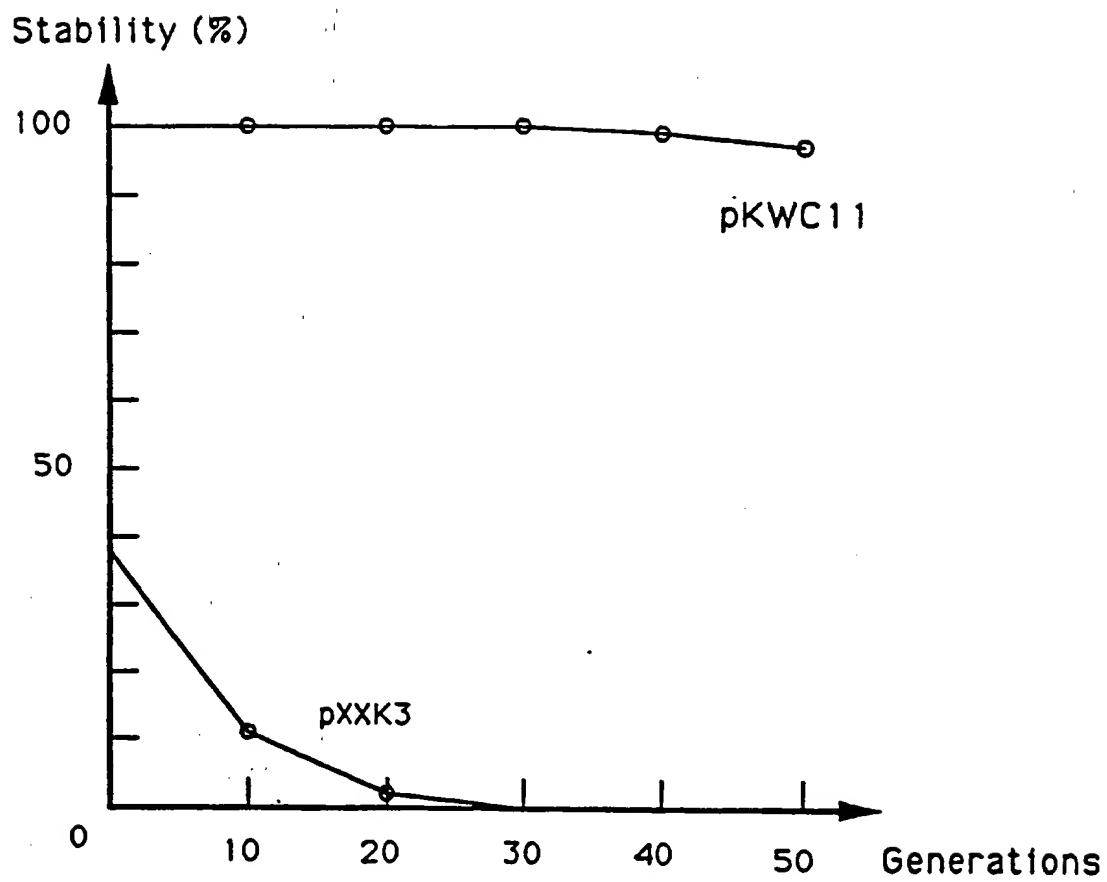


Figure 8

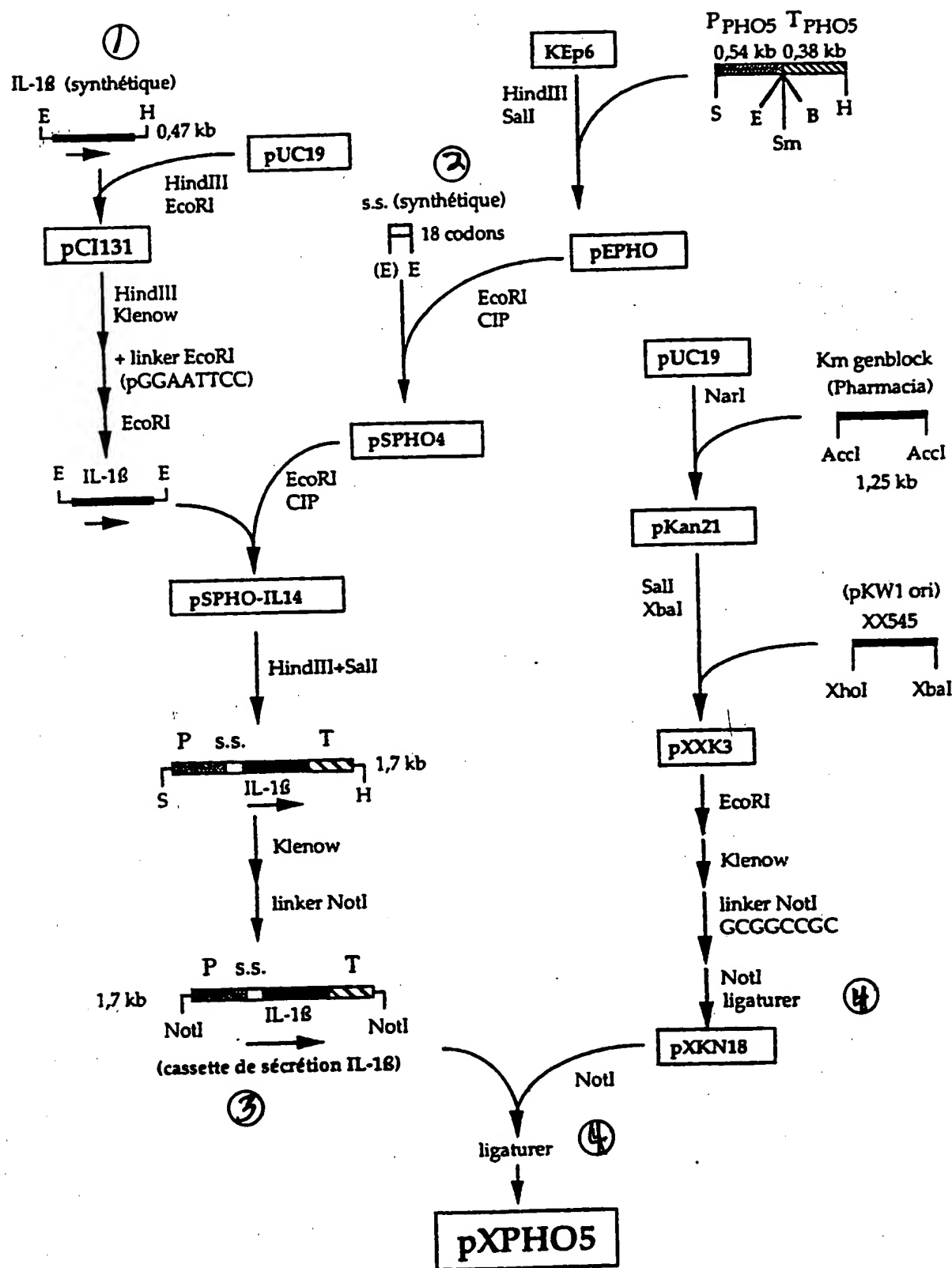


FIGURE 9

- Key: 1 IL-1 β (synthetic)
 2 s.s. (synthetic)
 3 (IL-1 β secretion cassette)
 4 ligate

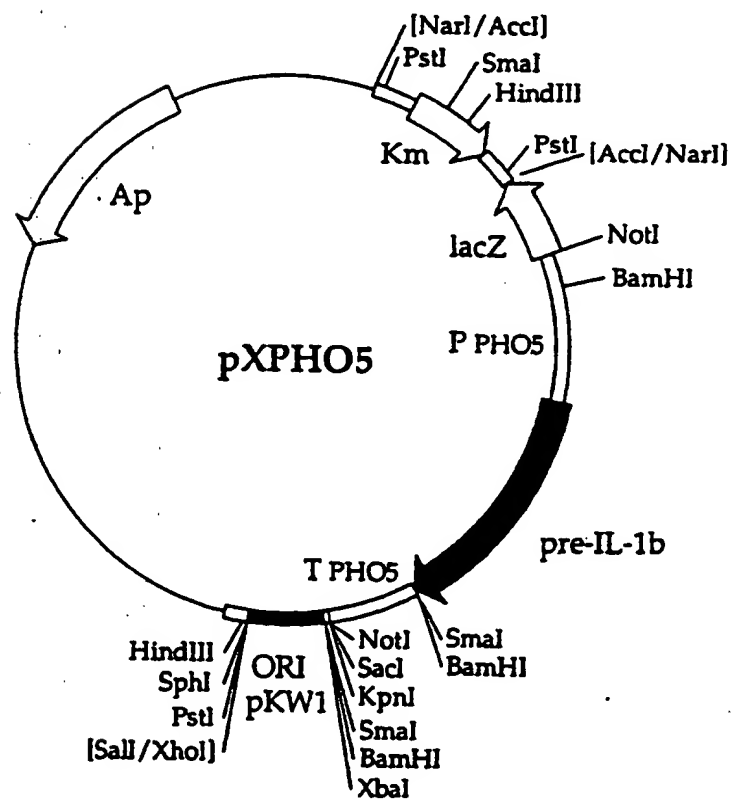
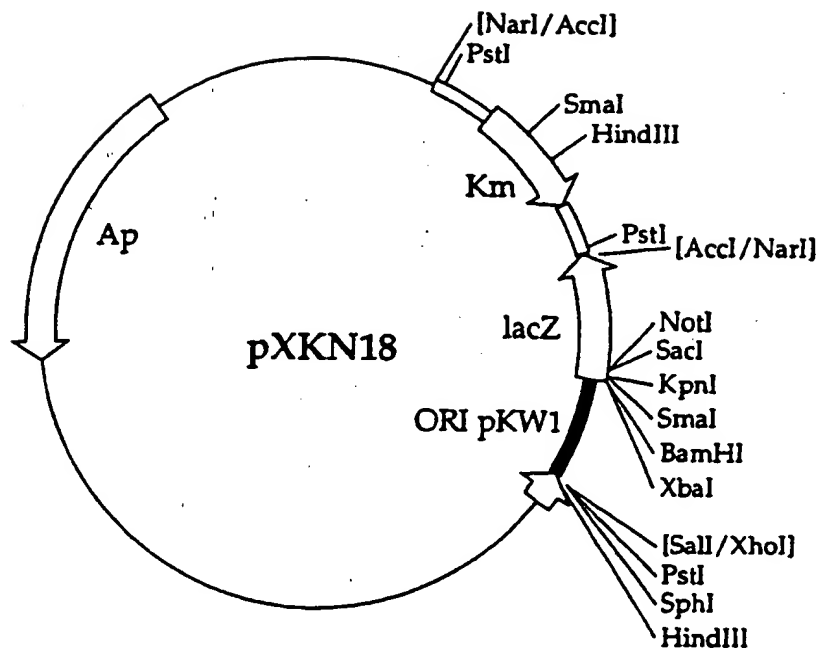
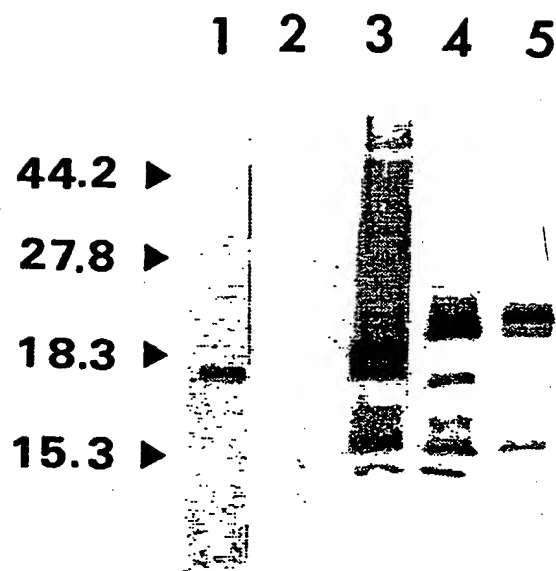


FIGURE 10

13 / 17



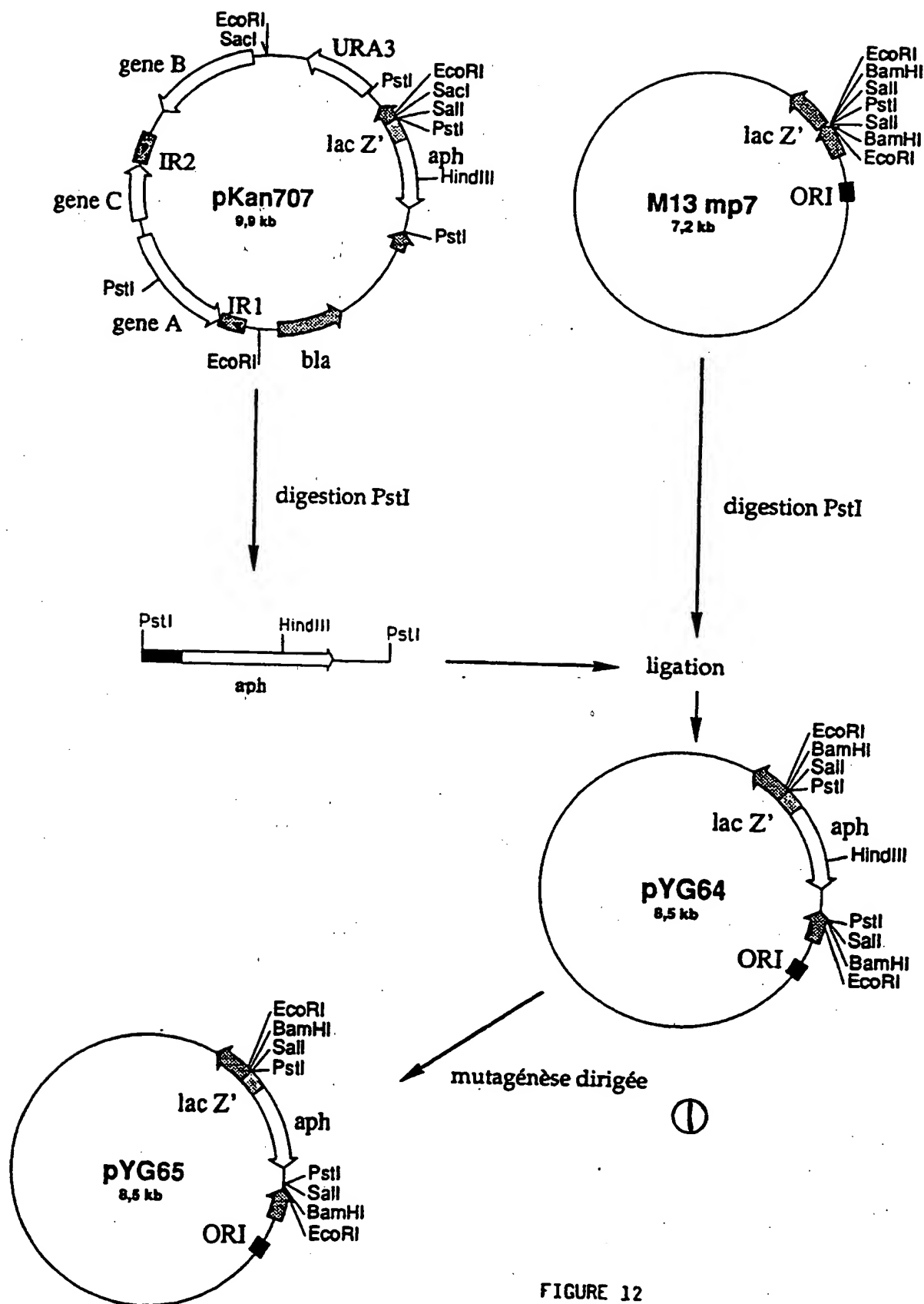


FIGURE 12

Key: 1 Directed mutagenesis

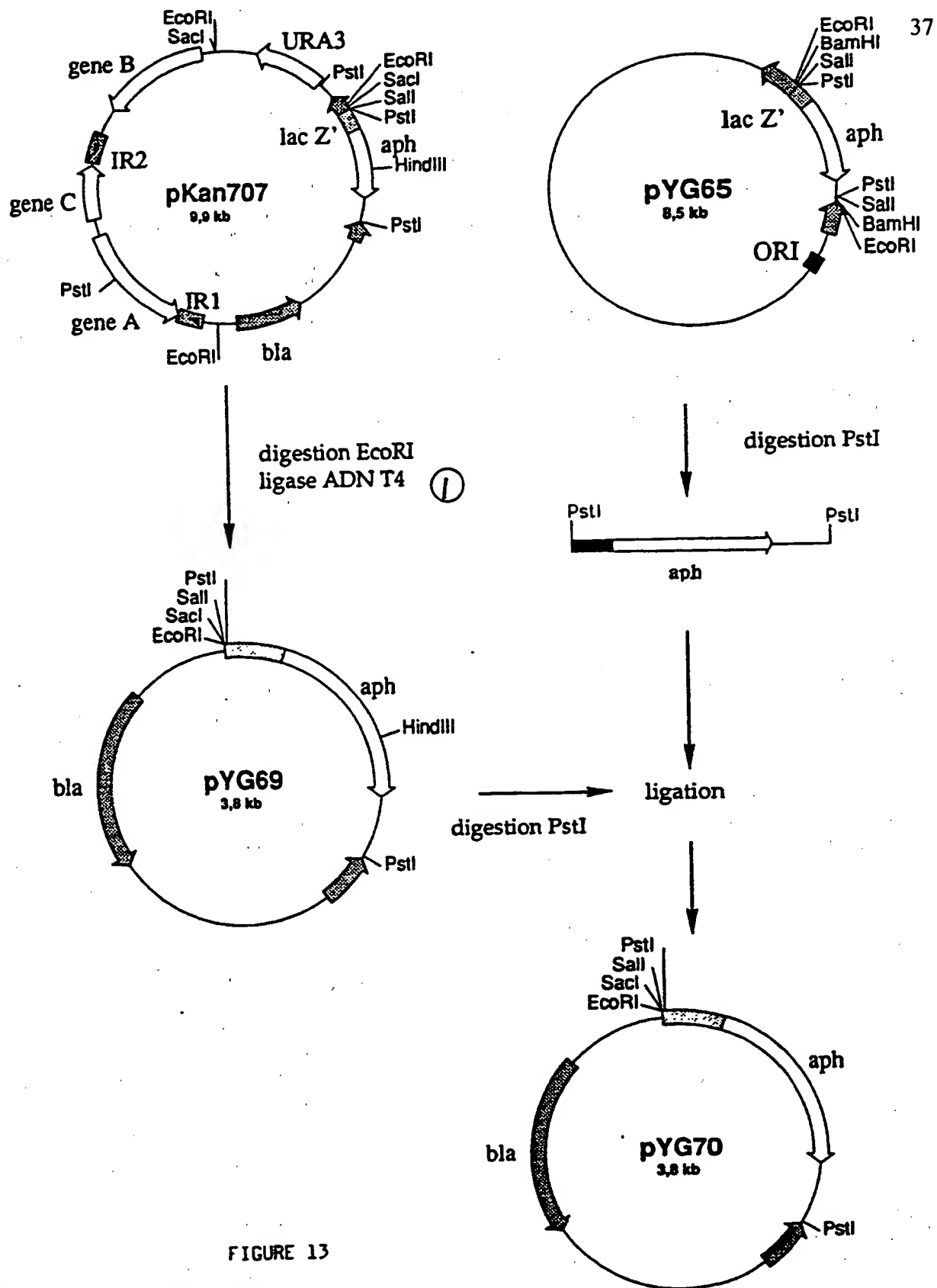


FIGURE 13

Key: 1 T4 DNA ligase

16/17

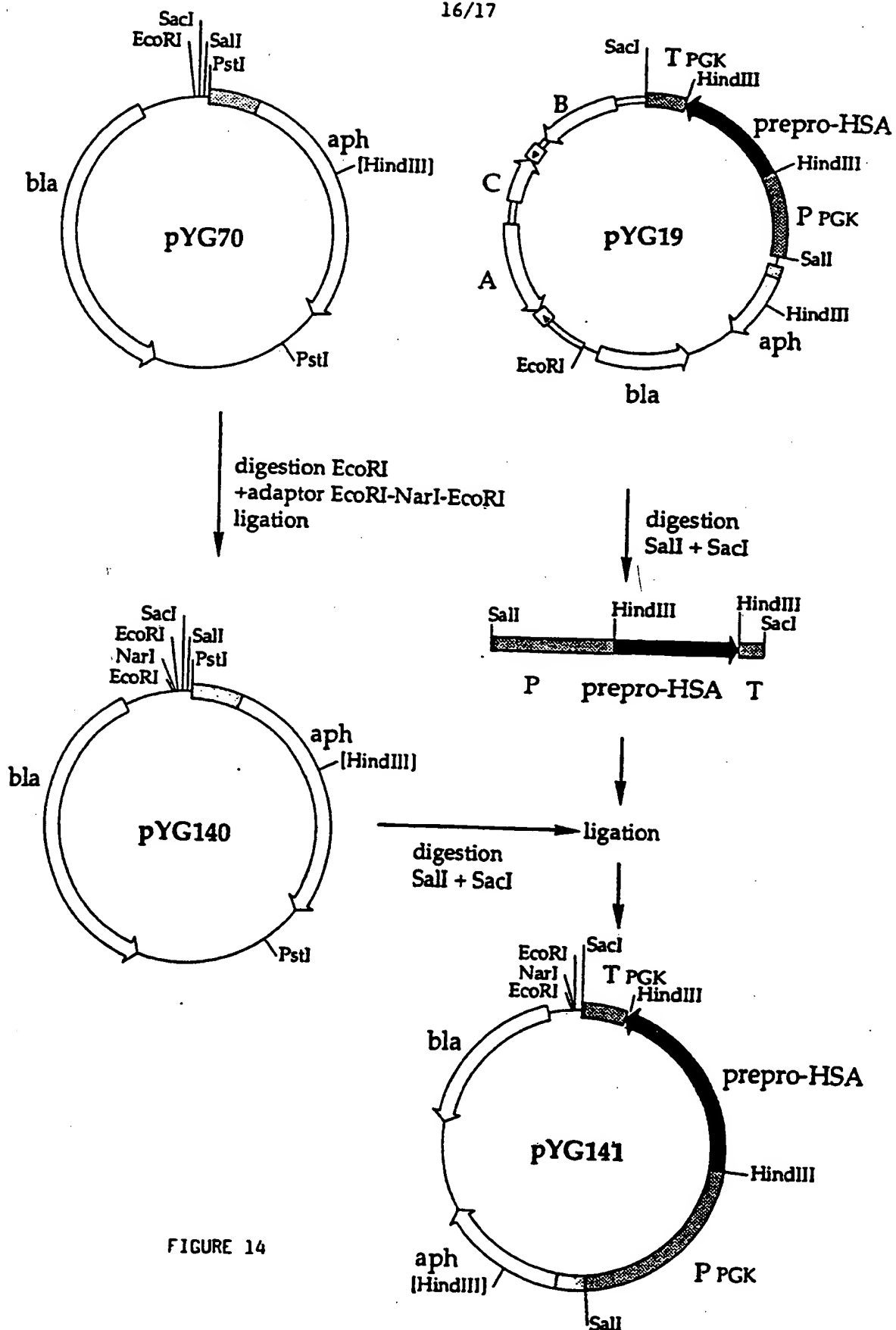


FIGURE 14

17/17

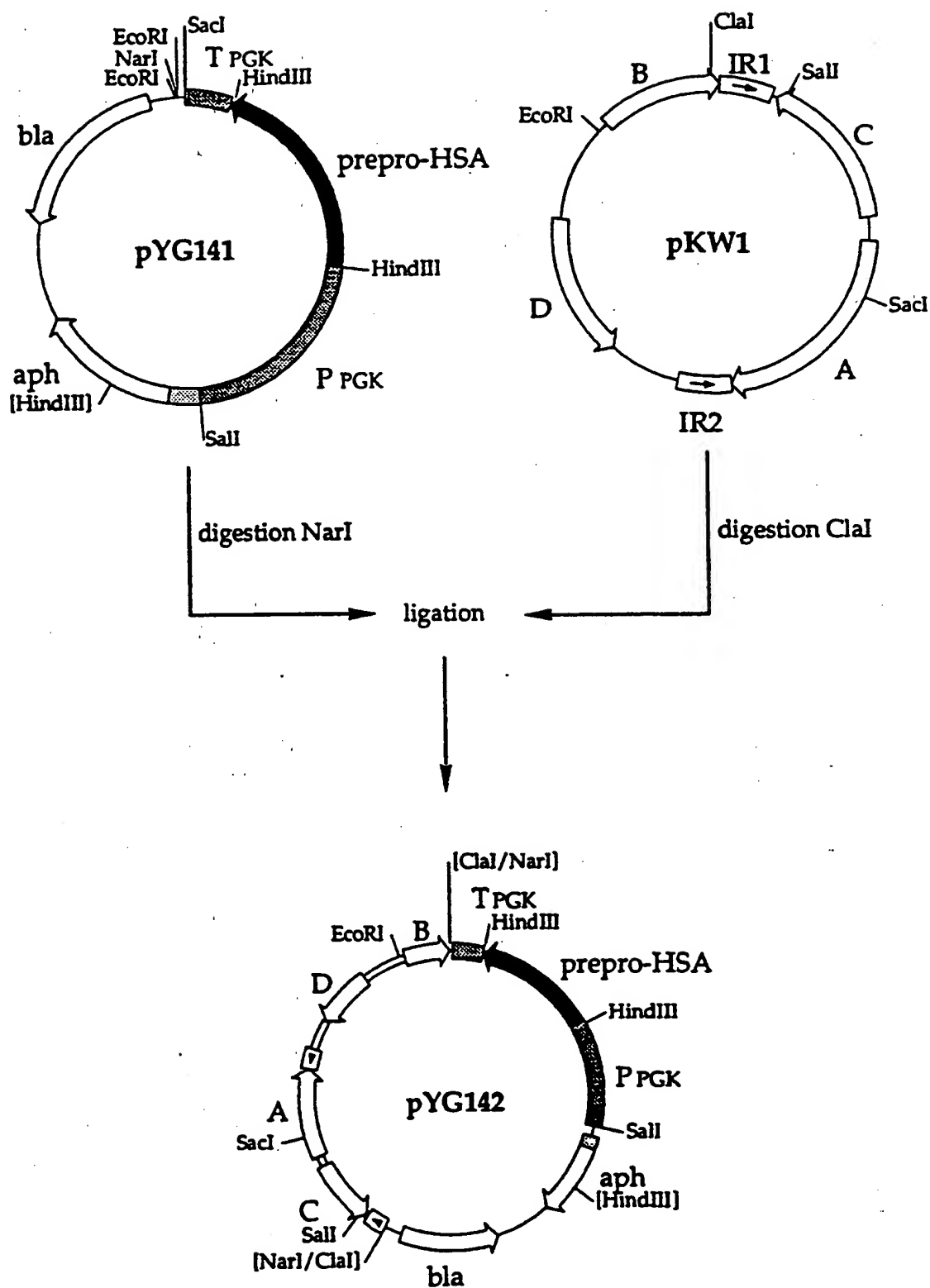


FIGURE 15

International Application No.: PCT/[illegible]

MICROORGANISMS

Optional sheet pertaining to the microorganism mentioned on page 20, lines 10-11 of the description¹:

A. Identification of the deposition²:

Other depositions are identified on a supplementary sheet³.

Name of the deposition institute⁴:

Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)

Address of the deposition institute (including the zip code and the country⁴):

Oosterstraat 1, P. O. Box 273 – 3740 AG Baarn (Netherlands)

Date of deposition⁵:

June 4, 1991

Sequential No.⁶:

CBS 290.91

B. Supplemental indications⁷ (to be filled out only if necessary). A separate sheet is attached for the continuation of this information

With regard to the designations under which a European patent is filed, a sample of the microorganism deposited will not be accessible prior to the date of publication of the mention of the grant of the European patent or the date when the application is rejected, withdrawn or considered to be rejected, unless a sample is made available by an expert designated by the requester (rule 28(4) of the EPC).

C. Designated states for which the indications are given³ (if the indications are not given for all the designated states)

D. Information supplied separately⁸ (to be filled out if necessary)

The information listed below will be later subjected to International Office⁹ (specify the general nature of the indications, for example, "Sequential No. of the deposit")

E. The present sheet was received with the international application when it was filed (to be verified by the receiving office)

[signature]

N. Saada

(Authorized employee)

Date received (originating from the applicant) by the International Office¹¹

(Authorized employee/officer)

Form PCT/RO/134 (January)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00559

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.5: C12N15/81

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.5: C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR,A,2 635 115 (RHONE-POULENC SANTE) 9 February 1990 —	1-28
X,P	JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY vol. 138, No.2, February 1992, COLCHESTER pages 337 - 345 X.J. CHEN ET AL. 'Characterization circular plasmid from the yeast Kluyveromyces waltii' —	
A	EP,A,0 301 670 (GIST-BROCADES N.V.) 1 February 1989 — -/-	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
9 October 1992 (09.10.92)Date of mailing of the international search report
26 October 1992 (26.10.92)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 92/00559

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CURRENT GENETICS vol. 19, No. 3, 1991, BERLIN, GERMANY pages 163 - 167 C. WILSON AND H. FUKUHARA 'Distribution of mitochondrial rl-type introns and the associated open reading frame in the yeast genus Kluyveromyces'</p>	

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

**FR 9200559
SA 61252**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 09/10/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2635115	09-02-90	AU-B- 623425	14-05-92
		AU-A- 3933289	08-02-90
		EP-A- 0361991	04-04-90
		FR-A- 2649991	25-01-91
		JP-A- 2276589	13-11-90

EP-A-0301670	01-02-89	US-A- 4943529	24-07-90
		AU-A- 2014888	02-03-89
		JP-A- 2000476	05-01-90

EPO FORM P0679

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82